

Aus der Abteilung für Virologie,
Fachrichtung Mikrobiologie und Hygiene,
Bereich der Klinischen Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg (Saar)

Direktorin: Prof. Dr. Sigrun Smola

**Untersuchungen zur Interaktion
viraler und zellulärer microRNAs
mit messengerRNA des Epstein-Barr-Virus**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2009

vorgelegt von Lothar Leißner
geb. am 11.1.1980 in Mülheim an der Ruhr

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VIII
TABELLENVERZEICHNIS	X
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	XI
1. ZUSAMMENFASSUNG	1
2. SUMMARY	1
3. EINLEITUNG	3
3.1 Viren	3
3.2 Das Epstein-Barr-Virus	3
3.2.1 Genom	5
3.2.2 Infektion und assoziierte Krankheiten	6
3.3 RNA-Interferenz	8
3.3.1 Biogenese und Wirkmechanismus von miRNAs	10
3.3.2 Funktionen und Zielgene von miRNAs	13
3.3.3 MiRNAs beim Epstein-Barr-Virus	14
3.4 Ausgangspunkt und Ziele der Arbeit	16
3.4.1 Prüfung viraler Targets für EBV-miRNA	16

3.4.2	Prüfung von LMP1 als Target für zelluläre miRNA-----	17
4.	MATERIAL-----	18
4.1	Chemikalien und Filter -----	18
4.2	Puffer und Lösungen -----	19
4.2.1	Allgemeine Puffer -----	19
4.2.2	Puffer für Isolierungen von Plasmid-DNA -----	20
4.2.3	Sonstige Puffer -----	21
4.3	Enzyme -----	21
4.4	Zelllinien -----	22
4.5	Bakterien-----	22
4.6	DNA-Größenmarker -----	23
4.7	Nähr- und Kulturmedien -----	23
4.7.1	Nährmedien für Bakterien-----	23
4.7.2	Kulturmedien für Säugerzellen-----	23
4.8	Template-DNA für die PCR-----	24
4.9	Synthetische Oligodesoxynukleotide -----	24
4.9.1	Primer für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) -----	24
4.9.2	Sequenzierungsprimer-----	25
4.10	Vektoren-----	25
4.10.1	Käuflich verfügbare Vektoren-----	25

4.10.1.1	pGEM®-T-Vektor-----	25
4.10.1.2	pSG5-Vektor-----	26
4.10.1.3	pEGFP-C1-Vektor-----	28
4.10.1.4	pGL3-Promoter-Vektor-----	29
4.10.2	Effektorplasmide-----	29
4.10.2.1	pSG5-miR-BART1-----	30
4.10.2.2	pSG5-miR-BART2-----	30
4.10.2.3	pSG5-miR-BHRF1-1-----	30
4.10.2.4	pSG5-miR-BHRF1-2+3-----	30
4.10.2.5	pSG5-miR-122-----	31
4.10.2.6	pSG5-miR-146a-----	31
4.10.2.7	pSG5-miR-155-----	31
4.10.2.8	pSG5-miR-223-----	31
4.10.3	Reportergenkonstrukte-----	31
4.10.3.1	pGL3-EB2-3'UTR-----	32
4.10.3.2	pGL3-anti-EB2-3'UTR-----	32
4.10.3.3	pGL3- BALF5-3'UTR-----	32
4.10.3.4	pGL3-LMP1-3'UTR-----	33
4.11	Computersoftware-----	33
4.12	Verwendete Laborgeräte-----	34

5. METHODEN	36
5.1 Bakterienkultur	36
5.1.1 Aufzucht und Lagerung	36
5.1.2 Herstellung kompetenter Bakterien	37
5.1.3 Transformation	38
5.1.4 Blue-White-Screening	39
5.2 Kultur eukaryotischer Zellen	40
5.2.1 Kultur von adhärent wachsenden Zellen	40
5.2.2 Transfektion eukaryotischer Zellen mit dem Transfektionsreagenz Nanofectin™	40
5.2.3 Zellzahlbestimmung mit dem CASY® Cell Counter	41
5.3 DNA-Techniken	42
5.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	42
5.3.2 Agarosegelelektrophorese	45
5.3.2.1 Agarosegelelektrophorese doppelsträngiger DNA	45
5.3.2.2 Herstellung eines Agarosegels	46
5.3.2.3 DNA-Isolierung aus Agarosegelen	47
5.3.3 Isolierung von Plasmid-DNA	48
5.3.3.1 Analytische DNA-Isolierung aus Bakterien	48
5.3.3.2 Präparative Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	49
5.3.4 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren	51

5.3.5	Enzymatische Modifikation von DNA-----	52
5.3.5.1	Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen -----	52
5.3.5.2	Dephosphorylierung von Vektor-DNA-Enden -----	53
5.3.5.3	Ligation von DNA-Fragmenten -----	54
5.3.6	DNA-Sequenzierungen -----	55
5.4	Der Luciferase-Reportergen-Assay -----	56
5.4.1	Interpretation der Messwerte-----	58
5.5	Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)-----	60
6.	ERGEBNISSE-----	65
6.1	Einfluss von miR-BART2 auf die EB2-3'-UTR-----	65
6.1.1	Klonierung der EB2-3'-UTR -----	65
6.1.2	Sequenzen der hergestellten Reporterkonstrukte-----	67
6.1.2.1	Sequenz von pGL3-anti-EB2-3'UTR -----	68
6.1.2.2	Sequenz von pGL3-EB2-3'UTR -----	69
6.1.3	Ergebnisse der Luciferase-Reportergen-Experimente -----	69
6.1.3.1	Einfluss der miR-155 auf den pGL3-Promoter-Vektor -----	71
6.1.3.2	Einfluss der miR-BART2 auf den pGL3-Promoter-Vektor-----	72
6.1.3.3	Einfluss von miR-BART2 und miR-155 auf pGL3-EB2-3'UTR-----	73
6.1.3.4	Einfluss von miR-BART2 und miR-155 auf pGL3-anti-EB2-3'UTR -----	74
6.2	Einfluss von B95-8-Stamm-miRNAs auf die BALF5-3'-UTR -----	75

6.2.1	Einfluss von miR-BART1 auf den pGL3-Promoter-Vektor	77
6.2.2	Einfluss von miR-BART1 auf pGL3-BALF5-3'UTR	78
6.2.3	Einfluss von miR-BART2 auf den pGL3-Promoter-Vektor	79
6.2.4	Einfluss von miR-BART2 auf pGL3-BALF5-3'UTR	80
6.2.5	Einfluss von miR-BHRF1-1 auf den pGL3-Promoter-Vektor	81
6.2.6	Einfluss von miR-BHRF1-1 auf pGL3-BALF5-3'UTR.....	82
6.2.7	Einfluss von miR-BHRF1-2 und -1-3 auf den pGL3-Promoter-Vektor.....	83
6.2.8	Einfluss von miR-BHRF1-2 und -1-3 auf pGL3-BALF5-3'UTR.....	84
6.2.9	Untersuchung möglicher Synergieeffekte	85
6.2.9.1	Einfluss von miR-BART2, -BHRF1-2 und -1-3 auf pGL3.....	85
6.2.9.2	Einfluss von miR-BART2, -BHRF1-2 und -1-3 auf pGL3-BALF5-3'UTR	86
6.3	Einfluss von miR-146 und miR-155 auf die LMP1-3'-UTR	88
6.3.1	Klonierung der LMP1-3'-UTR	88
6.3.1.1	Sequenz von pGL3-LMP1-3'UTR	90
6.3.2	Ergebnisse der Luciferase-Reportergen-Experimente	93
6.3.2.1	Einfluss der miR-223 auf den pGL3-Promoter-Vektor	94
6.3.2.2	Einfluss von miR-155 und miR-223 auf pGL3-LMP1-3'UTR	95
6.3.2.3	Einfluss von miR-146 und miR-223 auf den pGL3-Promoter-Vektor.....	96
6.3.2.4	Einfluss von miR-146 und miR-223 auf pGL3-LMP1-3'UTR	97
7.	DISKUSSION.....	98

7.1	Effekte bei als Kontrollen eingesetzten zellulären miRNAs	98
7.1.1	Steigerung der Luciferaseaktivität bei miR-155	98
7.1.1.1	Signifikanz vs. Plausibilität	98
7.1.1.2	Signifikanz vs. Relevanz	100
7.1.1.3	Beurteilung	101
7.1.2	Abnahme der Luciferaseaktivität bei miR-122	102
7.1.3	Verwendung der miR-155 als Kontroll-miRNA	103
7.2	Beeinflussung der EB2-3'-UTR	104
7.3	Beeinflussung der BALF5-3'-UTR	104
7.3.1	Einfluss durch B95-8-Stamm-EBV-miRNAs	104
7.3.2	Einfluss durch pSG5-miR-122	105
7.4	Beeinflussung der LMP1-3'-UTR	105
7.5	Identifikation von miRNA-Zielen <i>in silico</i> und <i>in vivo</i>	106
7.5.1	Schwierigkeit der Vorhersage von miRNA-Zielen	106
7.5.2	Konsequenzen aus der LMP1-Regulation durch BART-miRNAs	108
7.5.3	Unzuverlässigkeit derzeitiger Vorhersagen	110
8.	LITERATURVERZEICHNIS	112
9.	DANKSAGUNG	124
10.	LEBENS LAUF	125

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: EBV-Virion (elektronenmikroskopische Aufnahme) -----	5
Abb. 2.: Schematische Darstellung des EBV-Episoms -----	6
Abb. 3: Endemisches Burkitt-Lymphom -----	8
Abb. 4: Unterschiedliche Prozessierung von miRNA und siRNA -----	9
Abb. 5: Biogenese und Wirkmechanismus von miRNAs in Säugetieren -----	12
Abb. 6: EBV-kodierte Precursor-miRNAs des B95-8-Stammes -----	14
Abb. 7: Genomische Lokalisation von EBV-miRNAs -----	15
Abb. 8: Schematische Darstellung des Vektors pGEM®-T -----	26
Abb. 9: Schematische Darstellung des Vektors pSG5 -----	27
Abb. 10: Schematische Darstellung des Vektors pEGFP-C1 -----	28
Abb. 11: Schematische Darstellung des Vektors pGL3-Promoter -----	29
Abb. 12: Beispiel für Setzung eines Gates bei der FACS-Analyse. -----	62
Abb. 13: Differenzierung der Zellen im FACS nach ihrer Fluoreszenz -----	63
Abb. 14: Im Agarosegel aufgetrenntes Amplifikat eines Teils der EB2-3'-UTR -----	65
Abb. 15: Orientierungsverdau hergestellter Plasmide bei Klonierung der EB2-3'-UTR	66
Abb. 16: Probeverdau verwendeter EB2-3'-UTR-enthaltender Klone -----	67
Abb. 17: Einfluss von pSG5-miR-155 auf den Leervektor pGL3 -----	71
Abb. 18: Einfluss von pSG5-miR-BART2 auf den Leervektor pGL3 -----	72

Abb. 19: Einfluss von miR-BART2 und miR-155 auf pGL3-EB2-3'UTR-----	73
Abb. 20: Einfluss von miR-BART2 und miR-155 auf pGL3-anti-EB2-3'UTR -----	75
Abb. 21: Einfluss von pSG5-miR-BART1, -122 und -155 auf pGL3-----	77
Abb. 22: Einfluss von pSG5-miR-BART1, -122 und -155 auf pGL3-BALF5-3'UTR ----	78
Abb. 23: Einfluss von pSG5-miR-BART2, -122 und -155 auf pGL3-----	79
Abb. 24: Einfluss von pSG5-miR-BART2, -122 und -155 auf pGL3-BALF5-3'UTR ----	80
Abb. 25: Einfluss von pSG5-miR-BHRF1-1, -122 und -155 auf pGL3 -----	81
Abb. 26: Einfluss von pSG5-miR-BHRF1-1, -122 und -155 auf pGL3-BALF5-3'UTR--	82
Abb. 27: Einfluss von pSG5-miR-BHRF1-2+3, -122 und -155 auf pGL3-----	83
Abb. 28: Einfluss von pSG5-miR-BHRF1-2+3, -122 und -155 auf pGL3-----	84
Abb. 29: Effekt mehrerer koexprimierter miRNAs auf pGL3 -----	86
Abb. 30: Effekt mehrerer koexprimierter miRNAs auf pGL3-BALF5-3'UTR -----	87
Abb. 31: Amplifikation der LMP1-3'-UTR auf Agarosegel-----	88
Abb. 32: <i>Xba</i> -I-Verdau erzeugter pGEM-Klone -----	89
Abb. 33: Verdau potenziell LMP1-3'-UTR-enthaltender Klone mit <i>Eco</i> RI und <i>Bam</i> HI	89
Abb. 34: Einfluss von pSG5-miR-223 auf den pGL3-Promoter-Vektor -----	94
Abb. 35: Einfluss von pSG5-miR-155 und -223 auf pGL3-LMP1-3'UTR -----	95
Abb. 36: Einfluss von pSG5-miR-146 und -223 auf den pGL3-Promoter-Vektor-----	96
Abb. 37: Einfluss von pSG5-miR-146 und -223 auf pGL3-LMP1-3'UTR -----	97

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Vorhersagen viraler Zielgene für EBV-miRNAs (Pfeffer <i>et al.</i> , 2004) -----	16
Tabelle 2: Einzelschritte eines PCR-Zyklus -----	42
Tabelle 3: Pipettierschema eines Standard-PCR-Ansatzes -----	44
Tabelle 4: Programm einer Standard-PCR -----	45
Tabelle 5: Ideale Agarosekonzentrationen für bestimmte DNA-Trennbereiche -----	47

Abkürzungsverzeichnis

Größen und Einheiten

A	Ampere
bp	Basenpaare
g	Gramm
h	Stunde
kbp	Kilobasenpaare
l	Liter
λ	Wellenlänge
M	Molar
nt	Nukleotide
m	Milli-
μ	Mikro-
min	Minute
n	Nano-
OD	optische Dichte
p	Piko-
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
v/v	Volumen pro Volumen (volume per volume)
V	Volt
w/v	Gewicht pro Volumen (weight per volume)

Sonstige Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	bovines Serumalbumin
C	Cytosin
CCLR	cell culture lysis reagent
CIP	calf intestine phosphatase
CMV	Zytomegalie-Virus
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat

ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E. coli	Escherichia coli
EBNA	Epstein-Barr nuclear antigen
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
EGFP	enhanced green fluorescent protein
FACS	fluorescence-activated cell sorter
FCS	fetales Kälberserum
FSC	forward scatter
G	Guanin
H₂O_{(bi)dest}	(bi)destilliertes Wasser
HEK	human embryonic kidney (cells)
IPTG	Isopropylthiogalactosid
IM	Mononucleosis infectiosa
Kap.	Kapitel
LB	Luria Broth Base
LCL	lymphoblastoide Zelllinie (lymphoblastoid cell line)
LMP1	latentes Membranprotein 1
MCS	multiple cloning site
miRNA	MicroRNA
mRNA	Messenger-RNA
MOPS	3-(N-Morpholino)Propansulfonsäure
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
NCBI	National Center of Biotechnology Information
NPC	Nasopharyngealkarzinom
ORF	offener Leserahmen (open reading frame)
ori	Replikationsursprung (origin of replication)
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
pre-miRNA	Vorläufer-MicroRNA (Precursor-miRNA)
RLU	relative light unit
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz (RNA silencing)
RNAse	Ribonuklease
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	side scatter
STET	Saccharose / Tris(hydroxymethyl)-aminomethan / Ethylendiamintetraazetat / Triton [®] X-100 (Octoxinol-9)
SV40	Simian Vacuolating (Virus) 40
TAE	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan / Acetat / Ethylendiamintetraazetat
Taq	Thermus aquaticus
TE	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan / Ethylendiamintetraazetat
T	Thymin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

UTR	untranslated region
UV	Ultraviolett-
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactopyranoside

1. Zusammenfassung

Das Epstein-Barr-Virus (EBV) ist der Erreger der infektiösen Mononukleose und als onkogenes Virus an der Entstehung verschiedener humaner Tumorerkrankungen beteiligt. MicroRNAs (miRNAs) sind kurze, nicht kodierende RNAs, welche durch Inhibition der Proteinsynthese die Genexpression beeinflussen. EBV kodiert für wenigstens 25 eigene, virale miRNAs, deren Funktionen weitgehend unbekannt sind. Weiterhin verändert die EBV-Infektion die Expression zellulärer miRNAs. Für potenzielle Zielgene existieren *in-silico*-Vorhersagen, von denen zu Beginn der Experimente für diese Arbeit lediglich eine Interaktion der miR-BART2 mit der BALF5-Polymerase experimentell gesichert worden war.

Mittels geeigneter Reportergenkonstrukte und Koexpression der jeweiligen miRNA sollten weitere Interaktionen zwischen viralen Genen und sowohl viralen wie auch zellulären miRNAs gesucht oder bestätigt werden. Zwei der Reporterkonstrukte wurden dafür neu kloniert, eines enthält die vorhergesagten Bindungsstellen der EB2-3'-UTR für die miR-BART2 und das andere die vollständige LMP1-3'-UTR.

Als potenzielle Effektoren an der EB2-3'-UTR wurden die miR-BART2 und miR-155 getestet; an der BALF5-3'-UTR die miR-BART1, miR-BART2, miR-BHRF1-1, miR-BHRF1-2, miR-BHRF1-3, miR-155 und miR-122, zusätzlich Kombinationen aus miR-BART1, -BART2, -BHRF1-1, -1-2 und 1-3. Außerdem getestet wurden an der LMP1-3'-UTR die miR-155, miR-122 und miR-223.

Trotz bis zu 7-facher Wiederholung der Experimente und doppelten Ansätzen konnten in keiner der getesteten Konstellationen neue signifikante Effekte beobachtet werden, die auf eine spezifische Interaktion zwischen miRNA und 3'-UTR hinweisen würden. Allein der schon bekannte Effekt der EBV-miR-BART2 auf die BALF5-3'-UTR war reproduzierbar.

Die neu hergestellten Reportergenkonstrukte wären dazu geeignet, weitere Untersuchungen, z.B. mit anderen miRNAs durchzuführen. Dies wäre besonders dann sinnvoll, wenn neue, verlässlichere bioinformatische Zielvorhersagen zur Verfügung stehen.

2. Summary

The Epstein-Barr Virus (EBV) causes infectious mononucleosis and is involved in the genesis of different human malignancies. MicroRNAs are short, non-coding RNAs which alter gene expression by suppression of protein synthesis. EBV encodes at least 25 viral miRNAs whose functions are largely unknown. In addition, EBV-infection alters the expression of cellular microRNAs (miRNAs). Concerning potential target genes there are predictions *in silico*, which were experimentally validated only in the case of miR-BART2 controlling BALF5 polymerase at the time when this thesis was started.

To analyse potential target genes, suitable reporter gene constructs were generated and assayed by coexpression of the respective miRNA. For that purpose two of the constructs, one of them including the predicted binding sites of miR-BART2 in the EB2-3'-UTR, the other containing the complete LMP1-3'-UTR, were cloned.

As potential effectors binding to EB2-3'-UTR miR-BART2 and miR-155 were tested; regarding BALF5-3'-UTR miR-BART1, miR-BART2, miR-BHRF1-1, miR-BHRF1-2, miR-BHRF1-3, miR-155 and miR-122 were assayed. In addition, combinations consisting of miR-BART1, -BART2, -BHRF1-1, -1-2 und 1-3 were also tested. Furthermore potential binding of miR-155, miR-122 and miR-223 to LMP1-3'-UTR was studied. However, no significant effects were observed while the previously described effect of miR-BART2 on the BALF5-3'-UTR could be verified. The existing target constructs may be tested with other miRNAs once more reliable bioinformatical predictions were available.

3. Einleitung

3.1 Viren

Viren sind im Allgemeinen aus Proteinen und Nukleinsäuren aufgebaut und können in lebende Zellen eindringen. Sie enthalten als Erbinformation DNA oder RNA, aber nicht beide Molekülarten gleichzeitig und können – im Gegensatz zu Lebewesen – diese nicht alleine replizieren (Dörries, 2002). Dazu brauchen sie den Syntheseapparat der infizierten Zelle und weisen entsprechend spezifische Anpassungen auf. Die Wirtszellen haben dagegen Abwehrstrategien entwickelt, um der Infektion und Schädigung, die oft mit Lyse und Freisetzung neuer Viruspartikel endet, zu entgehen.

Wirt-Virus-Interaktionen nutzen verschiedene Mechanismen, deren Erforschung häufig auch eine praktische Nutzung ermöglichte. So fanden die in Bakterien vorkommenden Restriktionsendonukleasen (s. Kap. 5.3.5.1) als Standardwerkzeug breite gentechnische Verwendung und die in vielen menschlichen und tierischen Zellen wichtigen Interferone sind heute Bestandteil der Therapie von Hepatitiden oder Tumoren.

Eine andere Interaktionsmöglichkeit zwischen Viren und infizierten Zellen ist erst seit jüngerer Zeit bekannt: Sie funktioniert über RNA-Interferenz (RNAi) (s. Kap. 3.3), einem Vorgang, der bei Mehrzellern eine grundsätzliche Rolle in der Genregulation einnimmt. Dass die RNAi-vermittelnden Moleküle, microRNAs, auch von Viren kodiert werden, konnte als erstes für das Epstein-Barr-Virus gezeigt werden (Pfeffer *et al.*, 2004).

3.2 Das Epstein-Barr-Virus

Das Epstein-Barr-Virus (EBV) wurde im Jahr 1964 von Anthony Epstein, Budd Achong und Yvonne Barr in Ultradünnschnitten von kultivierten Lymphoblasten entdeckt (EPSTEIN *et al.*, 1964). Wenige Jahre zuvor hatte der britische

Kolonialchirurg Denis Burkitt eine bisher unbekannte Gruppe von Lymphomen beschrieben und für diese aufgrund klinischer und epidemiologischer Besonderheiten eine infektiöse Ursache vermutet (BURKITT, 1958; BURKITT & O'CONOR, 1961). Aus diesen Tumoren entstammten die Zellen, in denen der elektronenmikroskopische Nachweis der Viruspartikel gelang, womit die Entdecker das gesuchte infektiöse Agens gefunden hatten. Weiterhin hatten sie das erste onkogene Virus entdeckt, was, zumal sich in der Folge Assoziationen mit weiteren Malignomen herausstellten, bis heute das große Interesse an der Erforschung des EBV begründet (Delecluse *et al.*, 2007).

Das taxonomisch auch als humanes Herpesvirus 4 (HHV-4) bezeichnete Virus gehört als einziger humanpathogener Vertreter des Genus Lymphocryptovirus zur Subfamilie γ -Herpesvirinae der Herpesviridae (Kieff & Rickinson, 2006). Man unterscheidet die EBV-Typen 1 und 2, welche sich in ihren Allelen für die Kernproteine EBNA (Epstein-Barr nuclear antigen) -LP, -2, -3A, -3B und -3C unterscheiden (Sample *et al.*, 1990). In den Industrienationen dominiert Typ 1, während Typ 2 auch in Äquatorialafrika und Neuguinea vorkommt (Rowe *et al.*, 1989; Zimmer *et al.*, 1986).

Es verfügt über den für Herpesviren typischen Aufbau: Ein aus 162 Kapsomeren bestehendes, ikosaedrisches Nukleokapsid mit einem Durchmesser von 100-110 nm umschließt das 172 kbp (B95-8-Stamm) lange doppelsträngige, lineare DNA-Genom. Das Nukleokapsid ist von einer Lipidmembran (Envelope) mit Spikes umhüllt. Zwischen Kapsid und Hüllmembran befindet sich eine oft asymmetrisch verteilte, amorphe Proteinschicht, das Tegument (Pellett & Roizman, 2006; Kieff & Rickinson, 2006; Baer *et al.*, 1984). Eine elektronenmikroskopische Aufnahme eines Virions zeigt die Abb. 1.

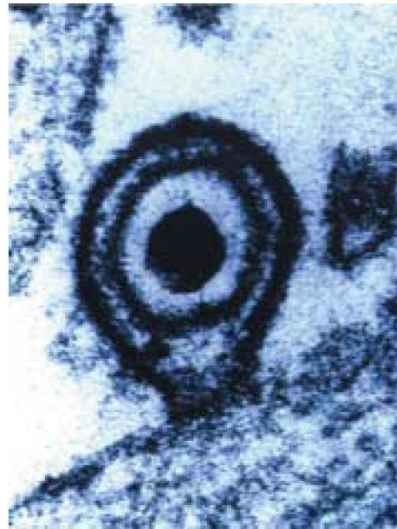


Abb. 1: EBV-Virion (elektronenmikroskopische Aufnahme)
(Young & Rickinson, 2004)

3.2.1 Genom

Das EBV-Genom war das erste vollständig klonierte und sequenzierte Herpesvirusgenom (Skare & Strominger, 1980; Arrand *et al.*, 1981; Polack *et al.*, 1984). Es ist je nach Stamm zwischen 172 und 184 kbp lang und sein GC-Gehalt liegt bei 60% (mol/mol) (Baer *et al.*, 1984; Kieff & Levine, 1974; Pritchett *et al.*, 1975). Im Nukleokapsid des Virions ist es linear angeordnet, zirkularisiert aber nach Infektion zum kovalent geschlossenen Episom (Alfieri *et al.*, 1991; Hurley & Thorley-Lawson, 1988). Eine schematische Darstellung des Episoms ist in Abb. 2 zu sehen.

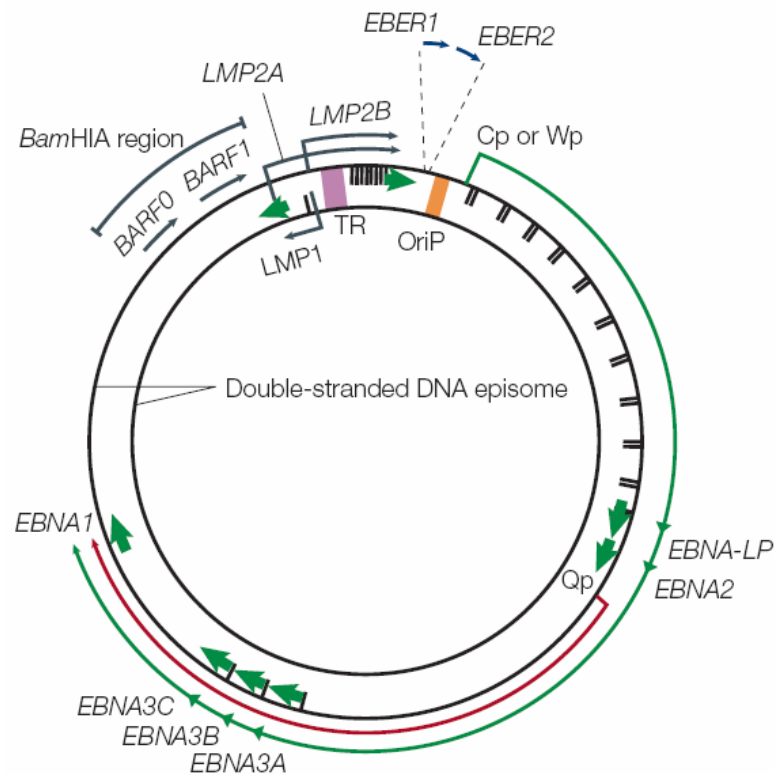


Abb. 2.: Schematische Darstellung des EBV-Episoms

Die Positionen der im latenten Zustand exprimierten Gene sind dargestellt und die Leserichtung durch Pfeile symbolisiert. Der Ursprung der Plasmidreplikation (OriP) ist orange markiert, der Bereich, an dem bei der Zirkularisierung die terminal repeats (TR) verbunden werden, violett (Young & Rickinson, 2004).

3.2.2 Infektion und assoziierte Krankheiten

Das EBV ist weltweit verbreitet und wird über die Speichelflüssigkeit übertragen (Gerber *et al.*, 1972). Da es nach Infektion im Organismus verbleibt, nimmt der Anteil der Träger mit steigendem Alter zu, bei Erwachsenen sind es über 90%. Je nach hygienischen Umständen und Lebensstandard erfolgt die Primärinfektion unterschiedlich früh, in Entwicklungsländern meist innerhalb der ersten Lebensjahre und in westlichen Ländern häufig erst bei Jugendlichen oder jungen Erwachsenen (Rickinson & Kieff, 2006). Während die Infektion im Kleinkindesalter meist

asymptomatisch verläuft, kommt es in späterem Lebensalter bei etwa der Hälfte der Fälle zum Krankheitsbild der Infektiösen Mononukleose (Henle *et al.*, 1968).

Die Replikation des Virus erfolgt in Epithelzellen des Oropharynx, die lytisch infiziert sind (Sixbey *et al.*, 1984). Über diese gelangt es in B-Lymphozyten, wo es normalerweise zu einer latenten Infektion kommt (Kieff & Rickinson, 2006). Dabei persistiert das Virus bei verminderter Genexpression ohne Ausbildung von Viruspartikeln und die virale DNA unterliegt dem Replikationszyklus der Wirtszelle (Aiyar *et al.*, 1998; Yates *et al.*, 1984). Je nachdem, welche Gene noch exprimiert werden, unterscheidet man verschiedene Latenztypen: 0, I, II und III (Rickinson & Kieff, 2006). Gelegentlich kommt es zur Reaktivierung des lytischen Zyklus und erneuten Vermehrung des Virus, wobei der genaue Mechanismus jedoch nicht vollständig aufgeklärt ist (Young & Rickinson, 2004).

Die lebenslange Persistenz in Gedächtniszellen bedeutet für den Wirt ein Risiko: EBV ist *in vitro* in der Lage, B-Zellen zu immortalisieren, wobei latent infizierte periphere B-Zellen spontan zu lymphoblastoiden Zelllinien (LCL) auswachsen (Pope *et al.*, 1968). *In vivo* gilt ein kausaler Zusammenhang mit verschiedenen malignen Erkrankungen als wahrscheinlich, insbesondere beim Burkitt-Lymphom, Nasopharyngealkarzinom, M. Hodgkin, bestimmten Magenkarzinomen, T- und NK-Zell-Karzinomen, Leiomyosarkomen und lymphoproliferativen Erkrankungen unter Immunsuppression (Rickinson & Kieff, 2006). Dagegen wird eine ätiologische Beteiligung bei weiteren Malignomen wie Mammakarzinomen oder primären Lebertumoren äußerst kontrovers gesehen (Murray, 2006; Herrmann & Niedobitek, 2003).

Ein Beispiel für ein Burkitt-Lymphom, der Erkrankung, die letztendlich erst zur Entdeckung des Virus führte, ist in der Abb. 3 gezeigt.

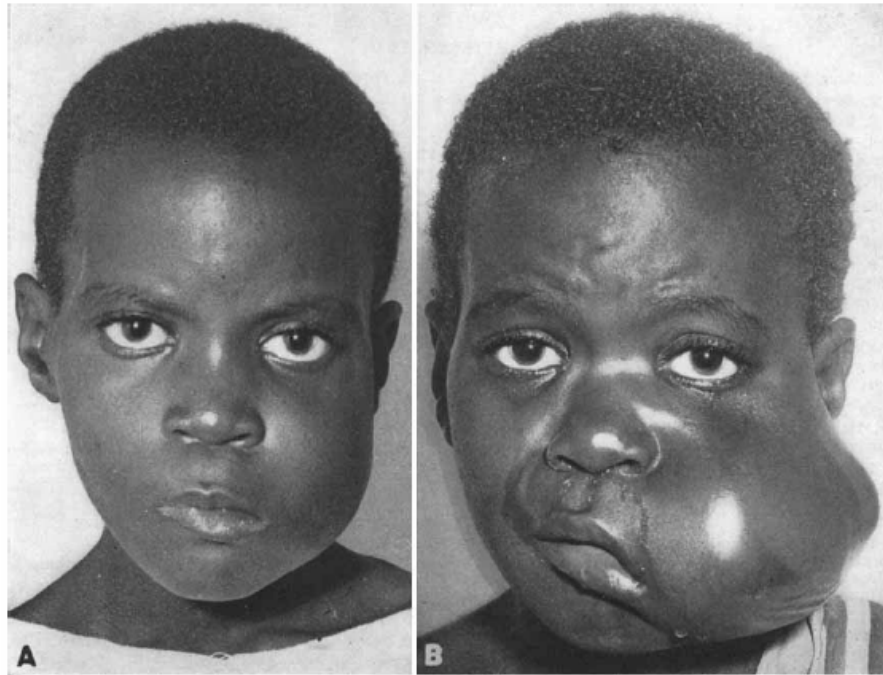


Abb. 3: Endemisches Burkitt-Lymphom

Manifestation an der linken Maxilla eines 10-jährigen Mädchens. Typisch ist das schnelle Wachstum: Zwischen beiden Aufnahmen liegen 8 Wochen (BURKITT & O'CONOR, 1961).

3.3 RNA-Interferenz

RNA-Interferenz ist ein Mechanismus der Regulation der Genexpression in Eukaryonten, bei dem nicht-kodierende 21-25 nt lange RNAs als zielerkennende Moleküle fungieren (Filipowicz *et al.*, 2005). In der Folge kommt es zu einer posttranskriptionellen Gensuppression.

Eine auf RNA-Interferenz beruhende Beobachtung wurde bereits 1990 von zwei Arbeitsgruppen beschrieben: Die zusätzliche Einführung eines pigmentproduzierenden Gens in Petunien führte überraschenderweise nicht zu einer stärkeren, sondern zu einer schwächeren oder sogar fehlenden Blütenfärbung (Napoli *et al.*, 1990; van der Krol *et al.*, 1990). Das endogene und das homologe eingeführte

Farbstoffen hemmten sich gegenseitig, ein Vorgang, für den man damals keine Erklärung hatte.

Je nach Herkunft und Prozessierung der vermittelnden Moleküle kann es sich um small interfering RNA (siRNA) oder microRNA (miRNA) handeln. Erstere werden aus langer doppelsträngiger RNA herausgeschnitten, während letztere aus endogenen Vorläufermolekülen prozessiert werden, die eine spezifische Haarnadelstruktur aufweisen (s. Abb. 4).

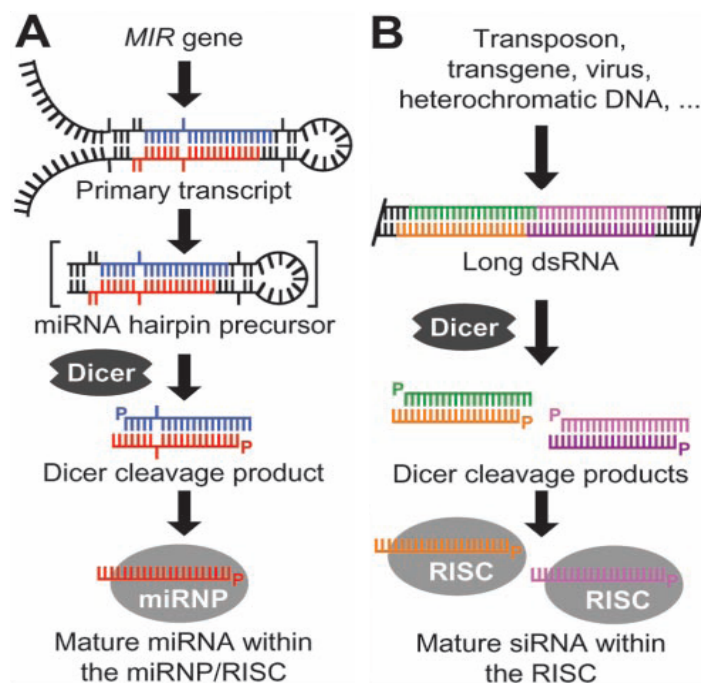


Abb. 4: Unterschiedliche Prozessierung von miRNA und siRNA

A. Das primäre Transkript legt sich in einem Bereich, der die miRNA-Sequenz (rot) enthält, zusammen. Vor der weiteren Prozessierung mittels Dicer wird es - in tierischen Zellen - zu der in Klammern gesetzten Haarnadelstruktur geschnitten, in Pflanzen wurde kein derartiges Zwischenprodukt nachgewiesen.

B. Aus langer ds-RNA werden mehrere verschiedene siRNAs herausgeschnitten, die von beiden Strängen des Vorläufers stammen

(Bartel & Bartel, 2003)

Für endogene siRNAs ist weiterhin typisch, dass sie den gleichen Genlokus regulieren, von dem sie her stammen („auto-silencing“), was die „zufällige“ gegenseitige Kontrolle der Blütenfarbstoffgene in der eingangs beschriebenen Konstellation erklärbar macht. Im Gegensatz dazu kontrollieren miRNAs unabhängige Gene, die nicht zwangsläufig in topographischer Beziehung zum miRNA-Gen stehen („hetero-silencing“) (Bartel, 2004). Im Folgenden wird auf miRNAs näher eingegangen.

3.3.1 Biogenese und Wirkmechanismus von miRNAs

MiRNAs werden in wachsender Anzahl für eine Vielzahl von Tieren, Pflanzen, Schleimpilze und Viren beschrieben. Beim Menschen sind mittlerweile über 700 miRNAs vorhergesagt worden (miRBase, Sanger). Ihre Gene sind im gesamten Genom verteilt, entweder als Einzelgene oder Gencluster. Einige sind zwischen anderen Genen lokalisiert, der wahrscheinlich größere Teil findet sich aber in den Introns oder Exons von Genen, mit denen sie gemeinsam transkribiert werden (Kim & Nam, 2006). Die Transkription erfolgt durch die RNA-Polymerase II und führt zu langen – bis zu mehreren kbp großen – primären miRNAs (pri-miRNAs). Diese haben eine 5'-Cap, am 3'-Ende eine Polyadenosinsequenz und enthalten mindestens eine haarnadelförmige Schleife von etwa 70 nt Länge (s. Abb. 5). Die Haarnadelschleife wird durch einen Mikroprozessorkomplex, der aus der ds-RNA-spezifischen RNase III Drosha und dem ds-RNA-bindenden Protein DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region gene 8) besteht, erkannt und herausgeschnitten (Denli *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2004). Die resultierende Vorläufer-miRNA (pre-miRNA) ist 60-100 nt lang und besitzt einen 3'-Überhang von 2 nt. Ihr Transport vom Zellkern ins Zytosol erfolgt mittels Exportin-5 und dessen Kofaktor Ran-GTP (Lund *et al.*, 2004; Yi *et al.*, 2003). Dort wird sie von Dicer, einer weiteren RNase III und der ds-RNA-bindendem Protein TRBP (immunodeficiency virus transactivation response RNA binding protein) zu einer imperfekten, etwa 20-25 nt langen miRNA-Duplex geschnitten (Hammond *et al.*, 2000; Hutvagner *et al.*, 2001).

Der Doppelstrang gelangt in einen sich formierenden Multiproteinkomplex RISC (RNA-induced silencing complex), zu dessen wesentlichen Komponenten Proteine der Argonaut-Familie gehören. Die genaue Zusammenlagerung, weitere Komponenten und beteiligte Proteine sind bislang allerdings nicht aufgeklärt (Wiemer, 2007). Der Strang der RNA-Duplex mit der schwächeren Basenpaarung am 5'-Ende stellt die miRNA dar und bleibt erhalten, während der Gegenstrang entfernt und abgebaut wird (Rand *et al.*, 2005; Wiemer, 2007). Die miRNA kann nun an eine mRNA-Zielsequenz, typischerweise in einer 3'-UTR, binden und damit den RISC in deren Nähe führen. Wenn eine vollständige Komplementarität zwischen miRNA und mRNA vorliegt, wird diese geschnitten und abgebaut (Tang *et al.*, 2003; Yekta *et al.*, 2004). Sind dagegen Ziel und miRNA nur teilweise komplementär, kommt es anstelle des Abbaus zur translationalen Repression (Zeng *et al.*, 2002). Dafür sind allerdings mehrere (gleiche oder verschiedene) miRNAs nötig, da eine einzelne miRNA, die in der 3'-UTR bindet, normalerweise nicht für eine messbare Translationshemmung ausreicht (Wiemer, 2007; Bartel, 2004). Wie genau die Hemmung funktioniert, ist nicht bekannt. Diskutiert werden eine Hemmung der Initiation, der Elongation oder auch eine gar nicht beeinträchtigte Proteinsynthese, bei der das Protein anschließend sofort wieder abgebaut wird (Pillai *et al.*, 2007; Bartel, 2004). Weiterhin wird vermutet, dass translational gehemmte mRNAs in sogenannten P-(processing-)Bodies akkumulieren (Liu *et al.*, 2005; Sen & Blau, 2005). Da dort Enzyme zum RNA-Abbau gefunden wurden, wäre dort ein Abbau der sequestrierten RNA anzunehmen, andererseits konnte aber gezeigt werden, dass auch diese mRNA wieder freigegeben werden kann (Bhattacharyya *et al.*, 2006).

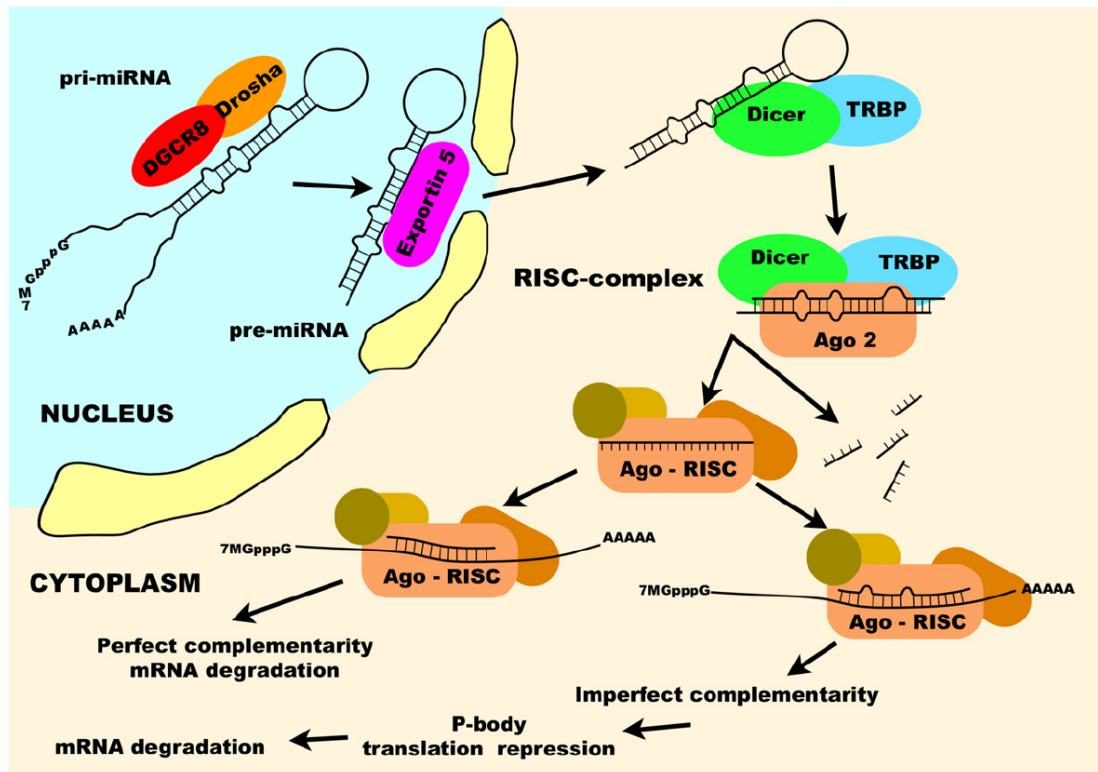


Abb. 5: Biogenese und Wirkmechanismus von miRNAs in Säugetieren

Ein haarnadelschleifenförmiger miRNA-Vorläufer (pre-miRNA) im Zellkern wird von Drosha aus der primären miRNA (pri-miRNA) herausgeschnitten. Nach Exportin-5-vermitteltem Transport ins Zytosol schneidet Dicer die Haarnadelstruktur zur einfachen Duplex ohne die beide Stränge kovalent verbindende Schleife. Im RNA-induziertem Silencing-Komplex (RISC) wird ein Strang entfernt und über den Gegenstrang die Bindung an eine Ziel-mRNA vermittelt. Je nach Komplementarität kommt es zu Abbau oder translationaler Repression der mRNA, wobei in letzterem Fall ein möglicher Abbau der reprimierten RNA erst nach Sequestrierung in P-Bodies erfolgt.

(Wiemer, 2007)

3.3.2 Funktionen und Zielgene von miRNAs

Es wird vermutet, dass etwa 30% aller menschlichen Gene durch miRNAs reguliert werden (Rajewsky, 2006b). Beispiele sind für verschiedenste Vorgänge beschrieben worden: Zellproliferation, -differenzierung und -zykluskontrolle, Apoptose, Fettstoffwechsel, Insulinsekretion, Erythro-, Granulo- und Megakaryopoese, Virusabwehr oder die Regulation anderer Immunvorgänge (Esau *et al.*, 2006; Poy *et al.*, 2004; Felli *et al.*, 2005; Fazi *et al.*, 2005; Garzon *et al.*, 2006; Lecellier *et al.*, 2005; Taganov *et al.*, 2006). Die Wichtigkeit für physiologische Vorgänge macht es wahrscheinlich, dass eine Fehlfunktion schwerwiegende Folgen für betroffene Zellen hat und damit auch in der Pathogenese von Krankheiten bedeutsam ist. In Leukämiezellen konnten fehlerhafte Expressionen von miRNAs bereits gezeigt werden (Calin *et al.*, 2002).

Trotz dieser Hinweise ist die Funktion der meisten miRNAs unbekannt, da man ihre genauen Zielgene nicht kennt. Stattdessen hat man computergestützte Vorhersagen gemacht, an welche Gene einzelne miRNAs binden könnten. Hierfür wurden verschiedene Algorithmen entwickelt, die beispielsweise die Komplementarität, Stabilität der Basenpaarung und die Konservierung der potenziellen Zielsequenzen berücksichtigen (Lewis *et al.*, 2003; John *et al.*, 2004; Brennecke *et al.*, 2005). Die als Seed-Sequenz bezeichneten ersten Nukleotide 2-7 sind dabei besonders wichtig (Lewis *et al.*, 2005). Neben dem grundsätzlichen Problem, dass sich die komplexen und teilweise unbekannten Vorgänge in der Zelle derzeit nicht mit Computerprogrammen abbilden lassen, besteht die Schwierigkeit, dass die meisten tierischen miRNAs zu ihrem Ziel nur unvollständig komplementär sind. Damit bleibt zum Nachweis einer miRNA-Funktion eine experimentelle Validierung notwendig.

3.3.3 MiRNAs beim Epstein-Barr-Virus

Im Jahr 2004 wurden die ersten viralen miRNAs entdeckt. Pfeffer *et al.* klonierte kleine RNA-Moleküle aus einer latent EBV-infizierten Burkitt-Lymphom-Zelllinie und identifizierte 5 verschiedene EBV-kodierte miRNAs (Pfeffer *et al.*, 2004) (s. Abb. 6).

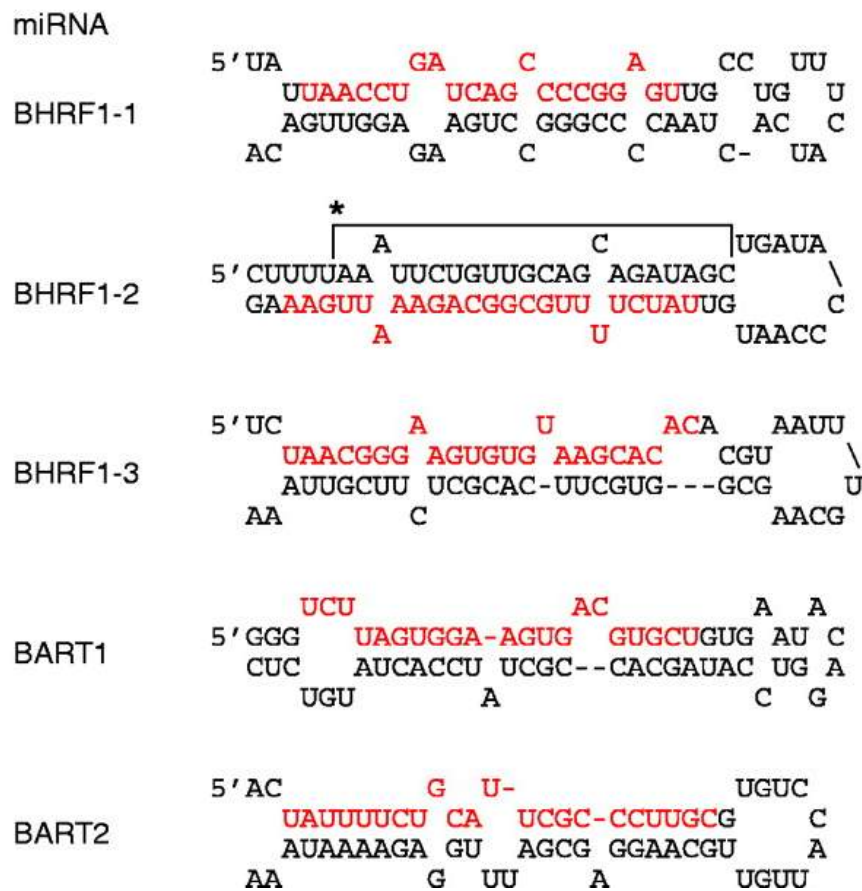


Abb. 6: EBV-kodierte Precursor-miRNAs des B95-8-Stammes

Die reifen miRNAs sind innerhalb der Vorläufer rot hervorgehoben (Pfeffer *et al.*, 2004)

Später wurden weitere miRNAs vorhergesagt und nachgewiesen, so dass man mittlerweile von mindestens 25 EBV-kodierten miRNAs ausgeht (Cai *et al.*, 2006; Grundhoff *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2009). Dass initial nur fünf miRNAs entdeckt wurden, liegt daran, dass die verwendete Zelllinie mit dem EBV-Stamm B95-8

transformiert ist, der eine genomische Deletion von ca. 12 kbp aufweist. Genau dort aber ist ein Großteil der später identifizierten miRNAs kodiert (s. Abb. 7).

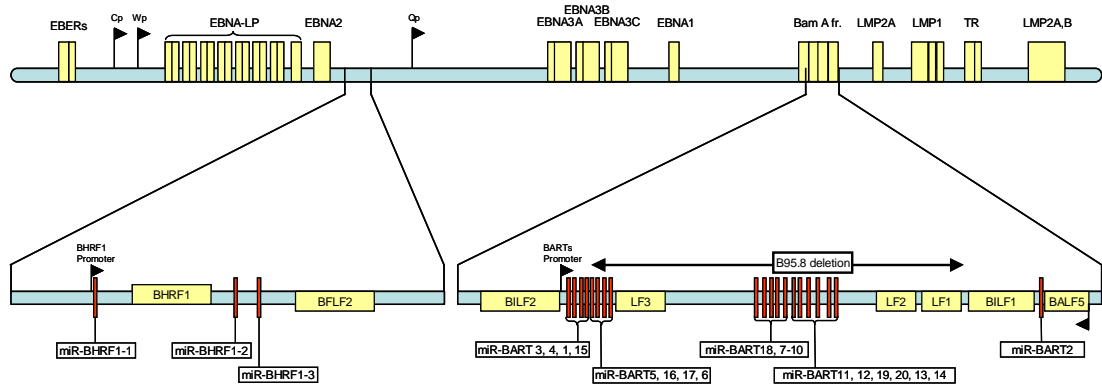


Abb. 7: Genomische Lokalisation von EBV-miRNAs

Der obere Teil zeigt die wichtigsten von latent infizierten B-Zellen exprimierten Gene. Darunter ist die Position der Cluster, in denen die miRNAs kodiert sind, vergrößert dargestellt. Die meisten BART-miRNAs liegen im Bereich der B95-8-Deletion.

Die Bezeichnungen der einzelnen miRNAs leiten sich von deren Positionen ab: Die miRNAs BHRF1-1 bis BHRF1-3 liegen auf dem *Bam*H1-Fragment **H** im nach rechts gelesenen offenen Leserahmen (frame) **1**, während die BART-miRNAs auf dem auf *Bam*H1-Fragment **A** nach rechts gelesenen Transkript kodiert sind.

Die einzelnen miRNAs werden in latent und lytisch infizierten Zellen sowie nach Gewebetyp unterschiedlich stark exprimiert. So werden die BART-miRNAs in latent infizierten Epithelzellen stark, in B-Zellen dagegen geringer exprimiert. Die BHRF1-miRNAs werden in B-Zellen des Latenttyps III in großer Menge gefunden, während sie in B- oder Epithelzellen der Latenttypen I und II praktisch nicht detektierbar sind (Cai *et al.*, 2006).

3.4 Ausgangspunkt und Ziele der Arbeit

3.4.1 Prüfung viraler Targets für EBV-miRNA

Pfeffer *et al.* hatte für die entdeckten viralen miRNAs mögliche Zielgene angegeben, zu denen auch virale Gene gehörten (s. Tabelle 1).

Tabelle 1: Vorhersagen viraler Zielgene für EBV-miRNAs (Pfeffer *et al.*, 2004)

Für die jeweiligen miRNAs sind mögliche Zielsequenzen aufgeführt. Die Spezifität der Bindung zwischen miRNA und mRNA wird durch einen Score ausgedrückt. Außerdem ist die Bindungsenergie dG (Gibbs' freie Energie) in kcal/mol angegeben. Die genomischen Positionsangaben beziehen sich auf das B95-8-Stamm-Genom (Gene Bank Accession Number V01555).

EBV miRNA	dG	Score	Genomic position	Target site location	Alignments (miRNA top row 3'-5')
BART1	-23.53	118	110328-110308	3' of BBLF4	UCGUGCAGUGAAGGUGAUUCU : AACAGGT - - CTTCCACTGAGA
BART1	-18.39	108	1990-2012	Putative 3' of LMP2A	UCGUGCAG - UG - AAGGUGAUUCU : : : CCCTCGTTGGCATTCTACTAGGA
BART1	-19.94	104	1049-1069	Putative 3' of LMP2A	UCGUGCAGUGAAGGUGAUUCU : : TGCTCTTCATGTCCACTGAGC
BART2	-39.86	165	153226-153203	3' of BALF5	CGUUCCCGCUUACGUCUUUUAU GCAAGGGCGAATGCAGAAAATA
BART2	-61.7	311	81713-81697 81962-81940 81994-81971	3' of BMLF1 (EB2)	CGUUCCCGCUUACGUCUUUUAU : : : : ATCTCCCGGGCGCAGAAAATG CGUUCCCG - CUUACGUCUUUUAU : : : : : : : CAGATGTCAGGGTGCAGAGGGTG CGUUCCCG - GCUUACGUCUUUUAU : : CCAAGGGTTTCATGGAGGAAATA

Zu Beginn der Experimente für diese Arbeit war in unserer Arbeitsgruppe bereits eine der vorhergesagten Interaktionen experimentell validiert worden: Die Regulation der BALF5-Polymerase (**B**amHI-Fragment **A** left frame 5) durch miR-BART2 konnte bis auf Protein- und Virusebene gezeigt werden (Barth *et al.*, 2008). Für dieselbe miRNA wurde aber noch ein weiteres Ziel angegeben: BMLF1

(*Bam*HI-Fragment **M left frame 1**), das auch als EB2 bezeichnet wird. Es ist als lytischer Aktivator essentiell für die Produktion infektiöser Viruspartikel (Gruffat *et al.*, 2002). Die Frage war, ob BMLF1 ebenfalls von der miR-BART2 reprimiert wird, was dazu passen würde, dass auch schon BALF5 für die lytische Virusreplikation wichtig ist. Um das herauszufinden, sollte ein geeignetes Reporter-genkonstrukt hergestellt werden, das die drei vorhergesagten Bindungsstellen der BMLF1-3'-UTR für die miR-BART2 enthält. Mit diesem Konstrukt sollte mittels Luciferase-Assays in entsprechend kotransfizierten, miR-BART2-exprimierenden Zellen, eine Interaktion überprüft werden (s. Kap. 6.1).

Es wird vermutet, dass die EBV-miRNAs zur Etablierung oder Aufrechterhaltung des latenten Zyklus beitragen (Barth *et al.*, 2008). Da der alleinige Effekt der miR-BART2 auf die BALF5-Polymerase dafür aber zu gering ist, ist es möglich, dass BALF5 durch weitere miRNAs reguliert wird. Dies sollte an einem bereits vorhandenen Reporterkonstrukt, das die BALF5-3'-UTR enthält, mit Luciferaseassays getestet werden (s. Kap. 6.2).

3.4.2 Prüfung von LMP1 als Target für zelluläre miRNA

Virale Gene werden nicht nur durch die viruseigenen miRNAs gesteuert. Für das Primate-Foamy-Virus 1 (PFV-1) wurde auch die Konstellation, dass zelluläre miRNAs virale mRNA hemmen, beschrieben (Lecellier *et al.*, 2005). Eine solche Abwehrfunktion bei anderen Virusinfektionen wäre am ehesten für zelluläre miRNAs denkbar, die bei Infektion hochreguliert werden. Für das EBV ist dies bei den miR-146 und -155 der Fall (Motsch *et al.*, 2007).

Als mögliches Ziel dieser miRNAs kam das latente Membranprotein 1 (LMP1) in Frage, das für die Transformation von B-Lymphozyten zu LCL notwendig ist (Kaye *et al.*, 1993). Da hierfür allerdings keine Vorhersagen zu möglichen Zielsequenzen vorlagen, musste für eine Testung die gesamte 3'-UTR des Proteins kloniert werden. Anschließend sollten mit dem Reporter-genkonstrukt und Luciferaseassays eine mögliche Interaktion mit miR-146 und miR-155 untersucht werden (s. Kap. 6.3).

4. Material

4.1 Chemikalien und Filter

Agarose	SeaKem (Rockland, USA)
Ampicillin	Ratiopharm
Bactoagar	DIFCO
Bromphenolblau	Serva
Bovines Serumalbumin (BSA)	New England Biolabs
Desoxyribonucleosidtriphosphate (dNTPs)	Boehringer (Mannheim) oder Finnzymes
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma oder Finnzymes
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Serva
Ethidiumbromid	Sigma
Fötales Kälberserum (FKS)	Seromed (Berlin)
Glycerol	Serva
Isopropylthiogalaktosid (IPTG)	Novagen
Natriumjodid	Sigma
Penicillin Streptomycin (100x)	PAA Laboratories GmbH
T	Thymin
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Serva
Triton® X-100	Serva
X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-galactopyranoside)	Sigma
Zellulosefilter Whatman™ #1	Herolab (Maidstone, USA)

Alle weiteren Chemikalien, die verwendet wurden und hier nicht aufgeführt sind, wurden über die Firmen Merck (Darmstadt) und Roth (Karlsruhe) in analysereiner Form bezogen.

4.2 Puffer und Lösungen

4.2.1 Allgemeine Puffer

Ethidiumbromidlösung	Ethidiumbromid	10 mg/ml H ₂ O
-----------------------------	----------------	---------------------------

Laufpuffer	Tris/HCl	0,025 M
	SDS	0,1% (w/v)
	Glycin	0,2 M

PBS	NaCl	140 mM
	KCl	25 mM
	MgCl ₂	0,5 mM
	CaCl ₂	1 mM
	Na-K-Phosphat	10 mM

Stopp-Lade-Mix (Blaumarker)	Bromphenolblau	0,25% (w/v)
	Glycerol	50% (v/v)
	EDTA	50 mM

TAE-Puffer 50fach	Tris	2 M
	Natriumacetat	25 mM
	EDTA	0,5 M
	ad pH 7,8 mit Essigsäure	

TE-Puffer	Tris	10 mM
	EDTA	1 mM
	ad pH 7,6 mit Essigsäure	

FACS-Fixierlösung	Paraformaldehyd	2% (w/v)
	NaCl in PBS	150 mM
	pH 7,5	

4.2.2 Puffer für Isolierungen von Plasmid-DNA

STET-Puffer	Tris (pH 8,0)	10 mM
	EDTA (pH 8,0)	50 mM
	Triton [®] X-100	0,5% (v/v)
	Saccharose	8% (w/v)
	Lysozym (Zugabe vor Gebrauch)	0,25 mg/ml

Resuspensionspuffer S1 (Macherey-Nagel Nucleobond [®])	Tris/HCl	50 mM
	EDTA	10 mM
	RNase A	100 µg /ml
	pH 8,0	

Lysepuffer S2 (Macherey-Nagel Nucleobond [®])	NaOH	200 mM
	SDS	1% (w/v)

Neutralisationspuffer S3 (Macherey-Nagel Nucleobond [®])	Kaliumacetat	2,8 M
	pH 5,1	

Äquilibrationpuffer N2 (Macherey-Nagel Nucleobond®)	Tris/H ₃ PO ₄	100 mM
	Ethanol	15% (Volumen)
	KCl	900 mM
	Triton® X-100	0,15% (Volumen)
	pH 6,3	

Waschpuffer N3 (Macherey-Nagel Nucleobond®)	Tris/H ₃ PO ₄	100 mM
	Ethanol	15% (Volumen)
	KCl	1,15 mM
	pH	6,3

Elutionspuffer N5 (Macherey-Nagel Nucleobond®)	Tris/H ₃ PO ₄	100 mM
	Ethanol	15% (Volumen)
	KCl	1 M
	pH 8,5	

4.2.3 Sonstige Puffer

Weitere Puffer, insbesondere spezielle Reaktionspuffer für bestimmte Enzyme werden bei der jeweiligen Methode genannt.

4.3 Enzyme

Alkalische Phosphatase (calf intestinal phosphatase, CIP)	Boehringer (Mannheim)
Lysozym aus Hühnereiweiß	Boehringer (Mannheim)
Phusion®-High-Fidelity-(HF-) DNA-Polymerase	Finnzymes
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs Inc. (NEB)
RNase A	Boehringer (Mannheim)

T4-DNA-Ligase	Promega
Thermus-aquaticus-(Taq-)Polymerase	Pharmacia Biotech oder Sigma
Trypsin-EDTA	PAA Laboratories GmbH

4.4 Zelllinien

HEK 293T

Humane embryonale Nierenzelllinie, die mit dem Adenovirus Typ 5 transformiert ist und das SV40T-Antigen exprimiert (Graham *et al.*, 1977; SHEIN & ENDERS, 1962; DuBridge *et al.*, 1987). Die Zelllinie wurde für alle Luciferase-Reportergenexperimente verwendet.

Jijoye

Von dieser Zelllinie wurde lediglich die zelluläre DNA verwendet. Es handelt sich um EBV-positive Tumorzellen, die ursprünglich von einem Burkitt-Lymphom-Patienten isoliert wurden (Bornkamm *et al.*, 1982; Hinuma *et al.*, 1967).

4.5 Bakterien

E. coli pMOSBlue

Diese Bakterien stammen aus dem „pMOS Blue T-Vector Kit“ der Firma Amersham. Sie wurden sowohl zur Vermehrung rekombinanter DNA als auch im Blue-White-Screening bei der Klonierung rekombinanter DNA eingesetzt.

4.6 DNA-Größenmarker

1 Kb plus DNA ladder™ (Invitrogen)

Bei der Agarosegelelektrophorese wurde zur Bestimmung der Größe doppelsträngiger linearer DNA (0,1-12 kbp) ein festgelegtes Gemisch verschieden großer DNA-Moleküle in definierten Längen und Mengenanteilen verwendet. Darin enthalten waren die folgenden Fragmentgrößen:

12000, 11000, 10000, 9000, 8000, 7000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2000, 1650, 1000, 850, 650, 500, 400, 300, 200, 100 bp

4.7 Nähr- und Kulturmedien

4.7.1 Nährmedien für Bakterien

Zur Anzucht von Bakterien in Flüssigkultur wurde 2,5% (w/v) LB-Medium (**Luria Broth Base** (GIBCO)) angesetzt und autoklaviert.

Zum Ausstrich der Bakterien auf Platten wurden Petrischalen mit 3,75% (w/v) **Luria's Agar** (GIBCO) hergestellt.

Zur Selektion von transformierten Bakterien wurde abhängig von dem jeweiligen Resistenzgen auf dem verwendeten Plasmid Ampicillin (0,1% [w/v]) oder Kanamycin (30 µg/ml Medium) zu den Nährmedien gegeben.

4.7.2 Kulturmedien für Säugerzellen

DMEM

Zur Kultivierung adhärenter Monolayer-Zellkulturen wurde Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, BioWhittaker) verwendet. Dieses wurde mit 10% fötalem Kälberserum (FKS, Biochrom) und einer Vierfach-Kombination aus den Antibiotika

Penicillin G (40 U/ml), Neomycinsulfat (10 µg/ml) und Streptomycinsulfat 50 µg/ml sowie dem Antimykotikum Nystatin (10 U/ml) ergänzt.

4.8 Template-DNA für die PCR

Um benötigte DNA-Abschnitte mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) aus dem EBV-Genom heraus zu amplifizieren, benötigte man eine geeignete DNA als Vorlage. Hierzu wurde zum einen zelluläre DNA aus Jijoye-Zellen verwendet, zum anderen DNA aus dem M-ABA-Stamm von EBV, die in Form von Cosmiden vorlag. Der transformierende Stamm M-ABA stammt ursprünglich aus Zellen eines Nasopharyngealkarzinoms (Polack *et al.*, 1984).

4.9 Synthetische Oligodesoxynukleotide

Oligodesoxynukleotide wurden als Primer für die PCR-Amplifikation und die Sequenzierung hergestellter Klone benötigt. Sie wurden von der Firma MWG Biotech bezogen. Es wurde möglichst darauf geachtet, dass die Base am jeweiligen Ende Cytosin (C) oder Guanin (G) ist. Die an diesen Stellen dann dreifache anstatt nur doppelte Wasserstoffbrückenbindung zum Komplementärstrang bewirkt dort eine höhere Bindungsenergie. Vor den Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme wurde ein Überhang von zwei Basen eingefügt, um ein besseres Schneiden zu ermöglichen (Kaufman & Evans, 1990). Diese Basen waren, aus demselben Grund wie oben, C und G.

4.9.1 Primer für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

5'EB2 UTR NheI:

5' CGG CTA GCT GGC TTT GGG CTC TGG AAG C 3'

3'EB2 UTR NheI BglII:

5' CGG CTA GCA GAT CTA GCT TGT AGC GCA TAG CTG C 3'

5' LMP1 XbaI EcoRI:

5' GCT CTA GAA TTC GGA AGG TAA GAG TGC CAT CTA TCT GTA C 3'

3' LMP1 XbaI:

5' GCT CTA GAC GGC CCA GTT CAG CTA AGC TAC TAT GAC TAA 3'

5' LMP1UTRXbaEco:

5' GCT CTA GAA TTC TGA AGA GCC CCC ACC GCC TTA TG 3'

3' LMP1UTRXba:

5' GCT CTA GAG GTG GAG ATG ATG ACG ACC CCC A 3'

4.9.2 Sequenzierungsprimer

5' pGL3 Seq:

5' ACC GAA AGG TCT TAC CGG AAA ACT CG 3

3' pGL3 Seq BglII:

5' GCGAGATCTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCC 3

4.10 Vektoren

4.10.1 Käuflich verfügbare Vektoren

4.10.1.1 pGEM[®]-T-Vektor

Der pGEM[®]-T-Vektor der Firma Promega wird zur Klonierung von PCR-Produkten verwendet. PCR-Amplifikate enthalten am 3'-Ende einen Überhang von einer Base, meistens Adenin (Clark, 1988; Hu, 1993), und können somit ohne einen vorherigen Restriktionsverdau in den mit überstehenden Desoxythymidinenden offenen Vektor eingefügt werden. Dies bietet sich auch als Zwischenschritt bei PCR-Produkten an, die eigentlich in einen anderen Vektoren kloniert werden sollen, aber dafür an den Enden geschnitten werden müssen. Das Schneiden an den mittels der Primer eingefügten Restriktionsschnittstellen kann je nach Enzym mangels ausreichend langer flankierender Sequenzen schwierig sein und nach der Ligation in pGEM besser funktionieren.

Die Ligation von Produkten ohne überhängende Desoxyadenosinenden erfolgt über die Multiple-Cloning-Site (MCS). Diese enthält Erkennungssequenzen mehrerer Restriktionsenzyme.

Der erfolgreiche Einbau des Inserts bewirkt eine Unterbrechung des lacZ-Markergens, die in einem Blue-White-Screening sichtbar wird. Der pGEM®-T Vektor besitzt neben den T7- und SP6-spezifischen Promotoren auch zwei verschiedene Replikationsursprünge (ori, origin of replication). Der Bakterien-ori verleiht ihm die Fähigkeit zur autonomen Replikation im prokaryotischen System und der ori aus dem filamentösen Phagen f1 ermöglicht die Erzeugung von Einzelstrang-DNA. Für die Selektion transformierter Bakterien besitzt der Vektor ein Ampicillinresistenzgen. Die Vektorkarte ist in Abb. 8 dargestellt.

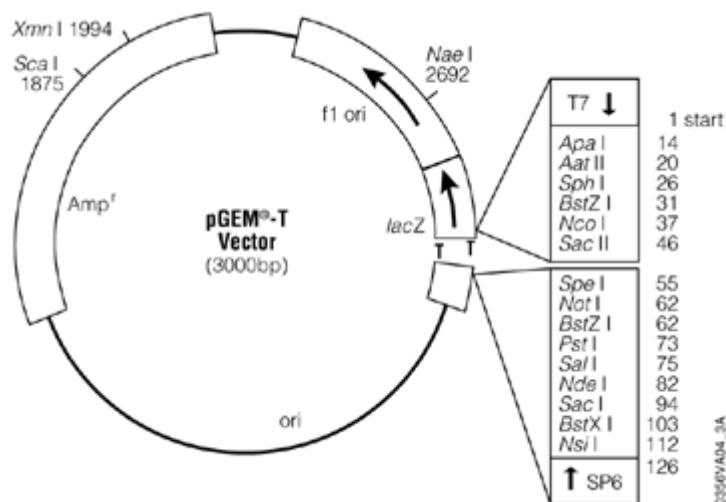


Abb. 8: Schematische Darstellung des Vektors pGEM®-T

4.10.1.2 pSG5-Vektor

Der pSG5-Vektor der Firma Stratagene wird überwiegend für die Expression im eukaryotischen System eingesetzt. Der Vektor zeichnet sich durch eine hohe Expressionsrate aus, die große Mengen an doppelsträngiger DNA liefert. Zudem kann der Vektor sowohl für Expressionen *in vivo* als auch *in vitro* verwendet werden. Der SV40-Promotor erleichtert die *In-vivo*-Expression während der T7-Promotor die

In-vitro-Transkription des klonierten Inserts vereinfacht. Die Ligation von Produkten erfolgt über die Multiple-Cloning-Site (MCS). Diese enthält die Erkennungssequenzen von EcoR I, BamH I und Bgl II. Der pSG5-Vektor besitzt drei Replikationsursprünge (ori, origin of replication). Der Bakterien-ori ermöglicht die autonome Replikation im prokaryotischen System und der ori aus dem filamentösen Phagen f1 ermöglicht die Erzeugung von Einzelstrang-DNA. Der SV40-ori erlaubt eine effiziente Replikation im eukaryonten Zellen, vor allem in solchen Zellen wie 293T, in denen das SV40-T-Antigen exprimiert wird. Für die Selektion in Bakterien und eukaryotischen Zellen enthält der 4,1 kbp große Vektor ein Ampicillinresistenzgen. Die Karte des Vektors ist in Abb. 9 zu sehen.

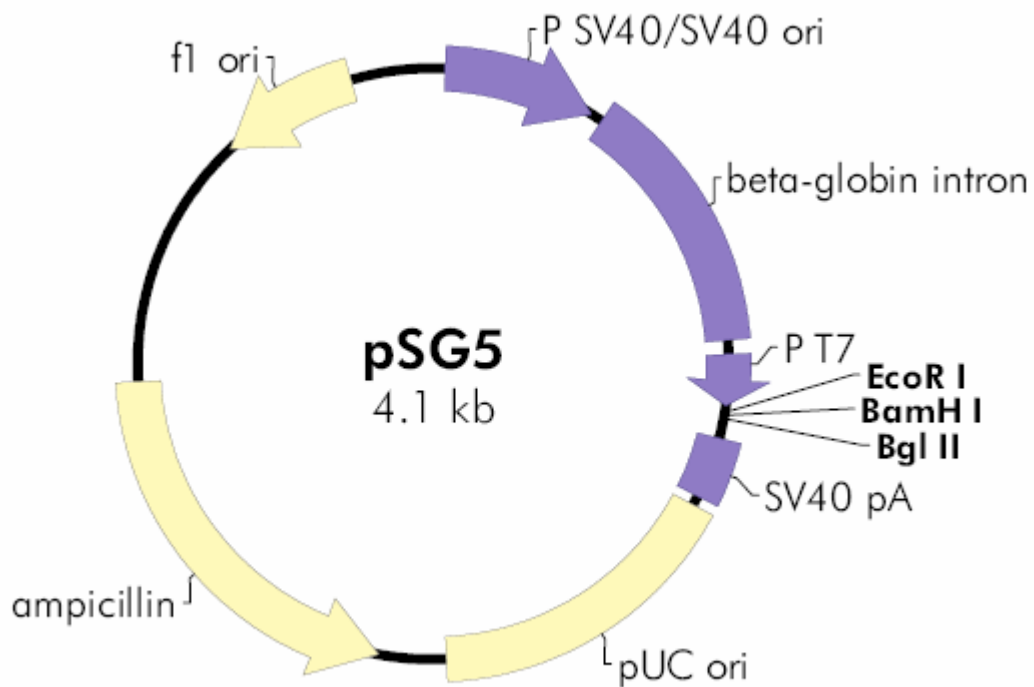


Abb. 9: Schematische Darstellung des Vektors pSG5

4.10.1.3 pEGFP-C1-Vektor

Der pEGFP-Vektor der Firma Clontech ist 4,7 kbp groß. Er dient der transienten oder, unter einer Kanamycin/Neomycin-Selektion, stabilen eukaryotischen Expression. Einklonierte Gene werden über den CMV-Promotor als Fusionsprotein mit dem enhanced green fluorescent protein (EGFP) exprimiert. Der EGFP-Anteil kann sowohl N-terminal, als auch C-terminal angefügt werden. Durch Anregung bei einer Wellenlänge von 488 nm kann die maximale Emission des EGFP-Chromophors bei 507 nm im Durchflusszytometer oder im Fluoreszenzmikroskop detektiert werden. Dadurch kann beispielsweise bei Kotransfektionen mit anderen Plasmiden im Durchflusszytometer die Transfektionsrate ermittelt werden. Eine Zeichnung des Vektors ist in Abb. 10 dargestellt.

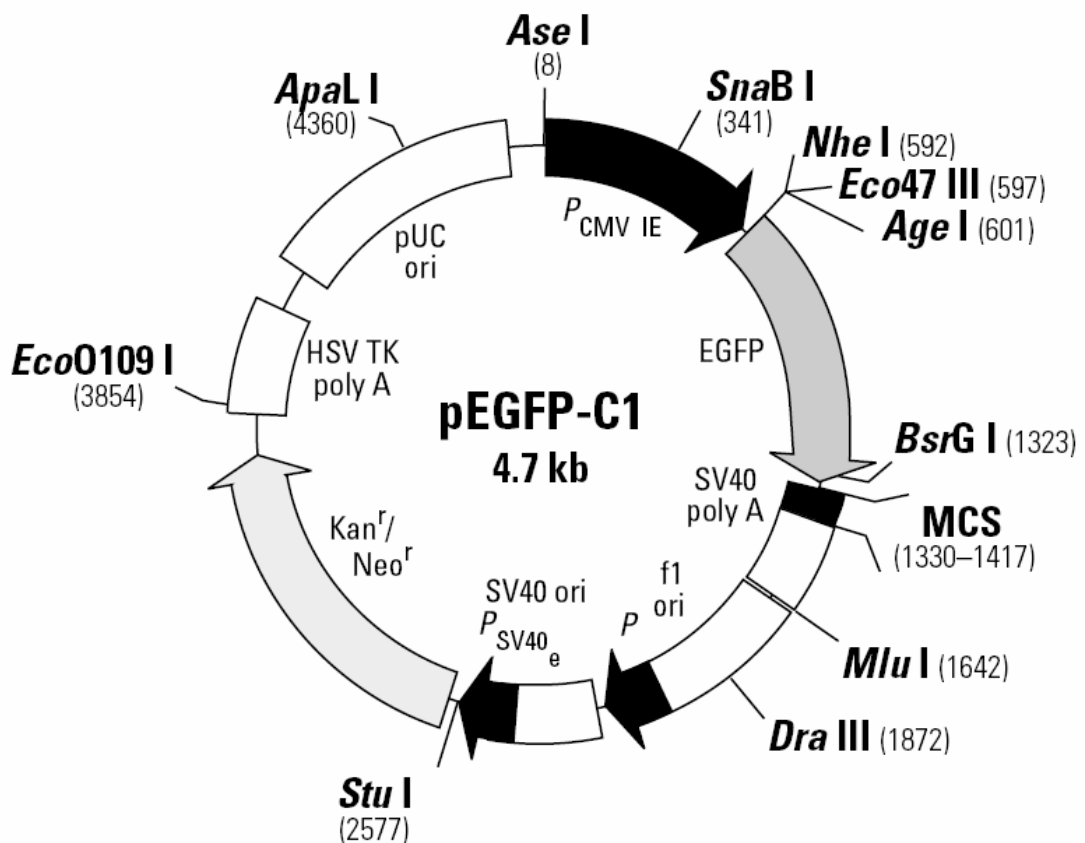


Abb. 10: Schematische Darstellung des Vektors pEGFP-C1

4.10.1.4 pGL3-Promoter-Vektor

Der pGL3-Promoter-Vektor der Firma Promega ist ein 4,8 kbp großer eukaryotischer Expressionsvektor. Er kodiert für die Firefly-Luciferase, die unter Kontrolle des SV40-Promotors steht. Der Vektor dient zur quantitativen Analyse von Faktoren, die einen Einfluss auf die Genregulation in Säugerzellen haben. Dies können sowohl cis- als auch trans-regulatorische Elemente sein. Hierzu zählen z.B. Enhancer und 3'-UTRs sowie DNA-bindende Faktoren.

Der Vektor besitzt zur Selektion transfizierter Zellen ein Ampicillinresistenzgen. Er verfügt ebenfalls über einen bakteriellen Replikationsursprung und den ori des filamentösen Phagen f1. Dem Luciferasegen vorgeschaltet liegt die MCS und nachgeschaltet ein „SV40 late polyA signal“. Dieses dient der Termination der Transkription und Polyadenylierung. Die Vektorkarte ist in Abb. 11 gezeigt.

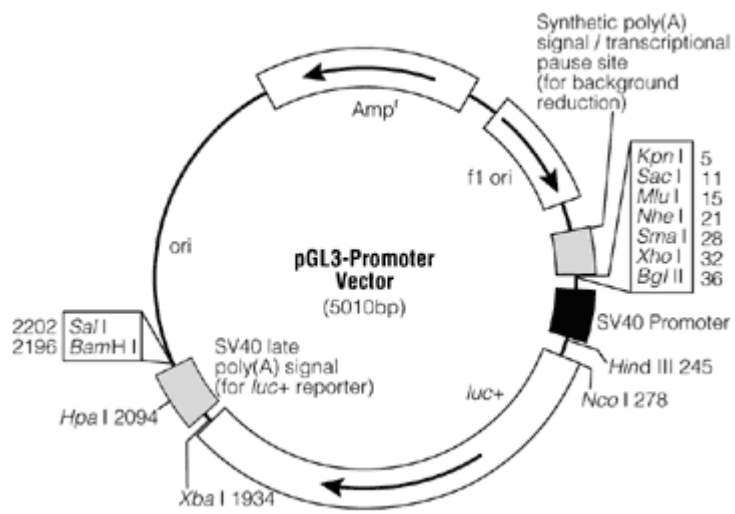


Abb. 11: Schematische Darstellung des Vektors pGL3-Promoter

4.10.2 Effektorplasmide

Effektorplasmide sind Plasmide, die der Expression von sowohl zellulären humanen als auch EBV-spezifischen miRNAs in Säugetierzellen dienen. Sie basieren auf dem

beschriebenen Expressionsvektor pSG5, in den jeweils die entsprechenden Sequenzen einkloniert waren. Die Konstrukte waren bereits für andere Experimente in der Arbeitsgruppe hergestellt worden und mussten lediglich in ausreichender Menge vermehrt werden. Sie wurden dankenswerterweise von Frau Dr. Stephanie Barth und Herrn Dipl. Biologen Thorsten Pfuhl zur Verfügung gestellt. Alle Plasmide waren vor der Verwendung mittels Northern-Blot-Analysen darauf getestet worden, dass transfizierte Zellen tatsächlich die reifen miRNAs bilden.

4.10.2.1 pSG5-miR-BART1

Dieses Plasmid dient der Expression der EBV-spezifischen miR-BART1.

4.10.2.2 pSG5-miR-BART2

Dieses Plasmid kodiert für die EBV-miRNA miR-BART2. Das einklonierte miRNA-kodierende Fragment wurde bei der Herstellung des Konstrukts aus genomischer DNA der B95-8-Zelllinie amplifiziert. Das 240 bp große Insert beinhaltet die Sequenz des miR-BART2-Vorläufers und flankierende Sequenzen (82 bp stromaufwärts und 98 bp stromabwärts). Diese sind notwendig um eine korrekte Prozessierung der pre-miRNA zur reifen miRNA zu gewährleisten (Zeng & Cullen, 2003).

4.10.2.3 pSG5-miR-BHRF1-1

Transfizierte Zellen bilden die EBV-miRNA miR-BHRF1-1.

4.10.2.4 pSG5-miR-BHRF1-2+3

Auf diesem Plasmid sind die beiden EBV-miRNAs miR-BHRF1-2 und -BHRF1-3 kodiert. Dementsprechend werden bei Transfektion beide miRNAs koexprimiert.

4.10.2.5 pSG5-miR-122

Zellen, die mit diesem Plasmid transfiziert sind, exprimieren die normalerweise leberspezifische, zelluläre miRNA miR-122.

4.10.2.6 pSG5-miR-146a

Dieses Plasmid kodiert für die zelluläre miR-146a, die in EBV-infizierten Zellen überexprimiert wird (Mrazek *et al.*, 2007).

4.10.2.7 pSG5-miR-155

Die zelluläre miR-155, die auf diesem Plasmid kodiert wird, wurde teilweise als unspezifische Kontroll-miRNA, zum anderen auch als denkbare Zielsequenz-bindende miRNA genutzt. Das einklonierte Insert wurde aus humaner genomischer DNA amplifiziert und ist 240 bp lang. Es umfasst auch die flankierenden Sequenzen (80 bp stromaufwärts und 96 bp stromabwärts) des für die miRNA kodierenden Bereichs.

4.10.2.8 pSG5-miR-223

Auf diesem Vektor ist die zelluläre miR-223 kodiert. Sie diente als unspezifische Kontrolle.

4.10.3 Reportergenkonstrukte

Die Reporterplasmidkonstrukte leiteten sich vom pGL3-Promoter-Vektor ab. Sie enthielten als potenzielle Zielsequenz für bindende miRNAs eine direkt hinter den offenen Leserahmen (ORF) der Luciferase einklonierte 3'-UTR, unter deren Kontrolle die Luciferase somit stand. Die Klonierung erfolgte, indem zunächst bei der Amplifikation des zukünftigen Inserts an dessen Enden mittels der Primer geeignete Restriktionsschnittstellen angefügt wurden; ein Verfahren, das auf Scharf zurück geht (Scharf *et al.*, 1986). Je nachdem, welche 3'-UTR als mögliche

Zielstruktur geprüft werden sollte, waren die Konstrukte bereits vorhanden oder mussten neu hergestellt werden.

4.10.3.1 pGL3-EB2-3'UTR

Dieser Vektor wurde neu hergestellt. Er enthält einen Teil der 3'-UTR des EB2-Gens, Position 81623-82085 im EBV-Genom des B95-8-Stamms (Gene Bank Accession Number V01555.2), der drei vorhergesagte mögliche Bindungstellen (Pfeffer *et al.*, 2004) für die miR-BART2 enthält. Er wurde mittels der Primer „5'EB2 UTR NheI“ und „3'EB2 UTR NheI BglII“ aus M-ABA-Cosmiden amplifiziert und in die Xba-I-Schnittstelle des pGL3-Promoter-Vektors kloniert. Da das EB2-Protein im Genom in seiner Leserichtung nach links (i.e. auf dem Gegenstrang) codiert ist, wurde auch die 3'-UTR ihrer funktionellen Orientierung entsprechend in den Vektor kloniert. Im Konstrukt wird sie daher in der entgegengesetzten Richtung zu der in der V01555.2 dargestellten Sequenz transkribiert. Das im Vektor klonierte Insert ist 476 bp groß. Seine Sequenz ist einschließlich der umgebenden Vektorbereiche in Kapitel 6.1.2.2 zu sehen.

4.10.3.2 pGL3-anti-EB2-3'UTR

Dieses Plasmid wurde parallel zum vorbeschriebenen Vektor hergestellt. Es unterschied sich lediglich in der Orientierung des Inserts. Dieses ist in umgekehrter und damit nicht der natürlichen Konstellation entsprechender Richtung inkloniert. Die Umkehrung würde vermuten lassen, dass ein potenzieller miRNA-Effekt auf die 3'-UTR beim dem anderen Vektor hier nicht mehr auftreten sollte. Damit bot sich das Plasmid als Kontrolle für die entsprechenden Luciferase-Assays an.

4.10.3.3 pGL3- BALF5-3'UTR

Dieses Plasmid enthält die komplette BALF5-3'-UTR, Position 152188-153228 im EBV-Genom des Wildtyps (Gene Bank Accession Number AJ507799) mit einer Länge von 1058 bp. Sie wurde durch PCR aus DNA des B95-8-Stamms amplifiziert

und besitzt eine experimentell belegte Bindungsstelle für miR-BART2 im Bereich 152747-152768 (Barth *et al.*, 2008). Der Vektor wurde zur Verfügung gestellt von Herrn Dipl. Biologen Thorsten Pfuhl.

4.10.3.4 pGL3-LMP1-3'UTR

Dieses Konstrukt musste neu hergestellt werden. Dazu wurde die gesamte 3'-UTR von LMP1, Position 166719-168213 im EBV-Genom des B95-8-Stamms (Gene Bank Accession Number V01555.2), kloniert. Das 1495 bp lange Insert wurde mittels der Primer „5'LMP1UTRXbaEco“ und „3'LMP1UTRXba“ aus M-ABA-Cosmiden amplifiziert und mittels der über die Primer eingefügten Schnittstellen in den pGL3-Promoter-Vektor kloniert. Auch hier wurde die Kodierung von LMP1 auf dem Gegenstrang berücksichtigt.

4.11 Computersoftware

NEB Cutter (www.neb.com)

Dieses Werkzeug ist nutzbar auf der Homepage der Firma New England Biolabs. Bei Primern, die eine Erkennungssequenz für ein Restriktionsenzym enthielten, wurde mit ihm ausgeschlossen, dass das Palindrom bereits in der zu amplifizierenden Sequenz vorhanden war.

FastPCR 4.0 (www.biocenter.helsinki.fi/bi/Programs/fastpcr.htm)

Mit dieser frei nutzbaren Software der University of Helsinki wurde das Primerdesign verfeinert. Unter anderem wurde ausgeschlossen, dass Primer eines Primerpaars untereinander oder an sich selbst binden können, sowie, dass in der zu amplifizierenden Sequenz zusätzliche unerwünschte Bindungsstellen vorkommen. Weiterhin wurde darauf geachtet, dass beide Primer einen ähnlichen Schmelzpunkt haben und keine Sekundärstrukturen ausbilden können.

GATCViewer™ 1.0 (www.gatc-biotech.com/de/mygatc/tools.html)

Mit dem kostenlosen GATCViewer™ der Firma GATC Biotech lassen sich Chromatogramm-Rohdaten, die bei der Sequenzierung von DNA generiert werden, anzeigen. Er wurde benötigt, um Auffälligkeiten im Sequenzierungsergebnis zu überprüfen.

Zur Textverarbeitung diente **Microsoft Office Word 2003**. Grafiken wurden mit **Adobe Photoshop 7.0** erstellt. Nukleotid-Sequenzabgleiche erfolgten über die Internetseiten des **National Center of Biotechnology Information** (NCBI) sowie angeschlossener Dienste. Die Werkzeuge des Portals **www.bioinformatics.org** erwiesen sich ebenfalls als nützlich bei der Beurteilung von Sequenzierungsergebnissen. Deskriptive Statistik der FACSAnalysen wurde mit **CellQuest Pro 3.1** von BD Biosciences durchgeführt, deskriptive und konfirmatorische Statistik mit **Systat Sigma Plot for Windows 10.0**.

4.12 Verwendete Laborgeräte

Durchflusszytometer

FACScan (Becton-Dickinson, BD)

Luminometer

Lumat LB9501 (Berthold Technologies GmbH & Co. KG)

Photometer

Ultraspec 3000 (Pharmacia Biotech)

Thermocycler

Peltier Thermal Cycler 200 (MJ Research Light Cycler)

UV-Gerät

Gelprint 2000i (MWG Biotech)

Zellanalysegerät

CASY® Cell Counter (Schärfe System)

Zentrifugen

Megafuge 1,0 RF (mit Kühlung) (Heraeus)

Picofuge (Tischzentrifuge ohne Kühlung) (Heraeus)

202 MK (Tischzentrifuge mit Kühlung) (Sigma)

5. Methoden

5.1 Bakterienkultur

5.1.1 Aufzucht und Lagerung

Um Plasmide zu amplifizieren, wurden mit ihnen Bakterien transformiert und diese vermehrt. Je nach benötigter Menge wurde ein entsprechendes Volumen LB-Medium mit den Bakterien beimpft. Zur selektiven Kultivierung wurde dem Medium ein Antibiotikum hinzugefügt, gegen das die Plasmid-enthaltenden Bakterien resistent waren. Abhängig vom jeweiligen Resistenzgen waren dies Ampicillin (0,1% [w/v]) oder Kanamycin (30 µg/ml).

Zum Animpfen des Mediums konnten auch eingefrorene Bakterien aus der Stammhaltung (DMSO-Stocks), die die benötigte DNA bereits besaßen, benutzt werden.

Zur Aufzucht für analytische Zwecke wurden zunächst Bakteriensuspensionen auf LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Dadurch konnten am Folgetag einzelne Kulturen gewonnen und die jeweiligen Klone separat in LB-Suspensionskulturen gezüchtet werden. Diese enthielten jeweils 2,5 ml Medium und wurden für 12-16 h bei 37 °C aerob auf dem Schüttler inkubiert.

Auch hier wurde den Agarplatten und Suspensionskulturen Ampicillin zugegeben.

Zur Aufbewahrung konnten 800 µl der Übernachtskulturen versetzt mit 20% (Volumen) DMSO als Frostschutz bei -70 °C gelagert werden.

Kurzfristig wurden Bakterien in Form von Zellkolonien auf Agarplatten, die mit Parafilm abgedichtet waren, bei 4 °C gelagert.

5.1.2 Herstellung kompetenter Bakterien

[CaCl₂/RbCl-Methode (Kushner, 1978)]

Kompetenz von Bakterien bezeichnet die Fähigkeit, fremde DNA aufzunehmen. Während viele diese Fähigkeit nicht haben und sogar Abwehrmechanismen dagegen entwickeln, besitzen andere Bakterien eine natürliche Kompetenz (Chen & Dubnau, 2004). *E. coli* gehört zu den erstgenannten, weshalb bei dem verwendeten pMOS-Stamm vor der Transformation eine Kompetenzinduktion durchgeführt werden musste.

Hierbei wird die Bakterienzellwand durch chemische Einflüsse durchlässig gemacht und DNA kann in die Zelle eingeschleust werden. Zur Herstellung transformationskompetenter Bakterien wurden 30 ml SOB-Medium mit bereits kompetenten Bakterien angeimpft. Diese Vorkultur wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 200 ml SOB-Medium mit 8 ml der Vorkultur angeimpft und bei 37°C inkubiert, bis die Bakterien sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden und die Suspension eine optische Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) von 0,3 erreicht hatte. Dann wurde die Bakterienkultur in 50-ml-Aliquoten 15 min auf Eis gehalten und anschließend 5 min bei 2 000 rpm und 4 °C abzentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0 RF). Die Bakterienpellets wurden nun in jeweils 16 ml Transformationspuffer 1 resuspendiert und erneut 15 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein zweiter Zentrifugationsschritt bei 4 °C und 2 000 rpm für 5 min. Die Bakterienpellets wurden nun in jeweils 4 ml Transformationspuffer 2 resuspendiert, zu je 200 µl aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefrostet. Die Lagerung erfolgte anschließend bei -70 °C.

Transformationspuffer 1	RbCl	0,10 M
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,05 M
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,01 M
	CH ₃ COOH (pH 7)	0,03 M
	Glycerol	15,0% (Volumen)

	ad 1000 ml H ₂ O _{bidest} sterilfiltriert
	pH 5,8 mit 0,2 M CH ₃ COOH eingestellt

Transformationspuffer 2	MOPS (pH 6,8)	0,500 M
	RbCl	0,010 M
	CaCl ₂ ·H ₂ O	0,075 M
	Glycerol	15% (Volumen)
	ad 1000 ml H ₂ O _{bidest} sterilfiltriert	

SOB-Medium	Trypton	20,0 g
	Hefe-Extrakt	5,0 g
	NaCl	0,6 g
	KCl 0,5 g ad 1000 ml H ₂ O _{bidest} autoklaviert	
	Zugabe von 20 mM MgCl ₂ direkt vor Gebrauch	

5.1.3 Transformation

(Lederberg & Cohen, 1974)

Transformation bezeichnet die Übertragung von DNA auf Bakterien. Die eingesetzte DNA liegt in Form eines Plasmids vor und trägt daher die Information für eine selbständige Replikation. Üblicherweise befinden sich auf dem Plasmid Gene, die der Zelle eine Resistenz gegen bestimmte Antibiotika verleihen. Dadurch ist eine Selektion von transformierten Bakterien möglich.

Für die Transformation wurde ein 200-µl-Aliquot kompetenter Bakterien auf Eis aufgetaut. Etwa 60 µl davon wurden mit 20 ng Plasmid-DNA oder 250 ng DNA (ca. 10 µl) aus einem Ligationsansatz vermischt und 20 min auf Eis inkubiert. Während dieser Zeit konnte sich die DNA an die Zelloberfläche der Bakterien anzulagern. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 90 s bei 42 °C im Wasserbad, wodurch die Bakterienzellwand kurzfristig permeabel wird und die DNA in die Zelle gelangt.

Danach wurde der Ansatz 2 min auf Eis gekühlt, wodurch die Permeabilität wieder nachlässt, und 1 ml LB-Medium hinzugefügt. Diese Vorkultur wurde 30 min lang bei 37 °C bebrütet.

Um erfolgreich transformierte Bakterien zu selektionieren, enthielten die Platten oder Flüssigmedien, die nach der Vorkultur mit dem Ansatz beimpft wurden, Ampicillin. Sie wurden über Nacht bei 37 °C bebrütet.

Die Vorkultur ohne Antibiotikum soll den durch den Hitzeschock gestressten Bakterien das Erreichen eines exponentiellen Wachstums erleichtern, bevor sie dem Selektionsdruck ausgesetzt werden. Dadurch sollte eine Erhöhung der Bakterienausbeute erreicht werden.

5.1.4 Blue-White-Screening

Das Blue-White-Screening prüft den Erfolg der Ligation eines Inserts in einen Vektor, der das lacZ-Gen enthält.. Dieses kodiert für das Enzym β -Galaktosidase, die das Substrat 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galactopyranosid (X-Gal) bei Vorhandensein des Induktors Isopropylthiogalactosid (IPTG) zu einem blauen Farbstoff umwandelt. Wird das lacZ-Gen durch den Einbau des Inserts unterbrochen, kann keine β -Galaktosidase mehr gebildet werden; die Kolonien der den Vektor enthaltenden Bakterien behalten dann ihre normale Farbe. Dagegen bilden Bakterien, die mit dem Vektor ohne ligiertes Insert transformiert sind, das Enzym, und ihre Kolonien färben sich blau. So kann auf der Agarplatte optisch unterschieden werden, welche Klone den Vektor mit eingebautem Insert tragen und welche nicht.

Die Methode ist nur anwendbar mit Bakterienstämmen, die natürlicherweise keine β -Galaktosidase bilden, wie dem hier verwendeten E.-coli.-pMOS-Stamm. Die Agarplatten enthielten Ampicillin, damit keine Bakterien wachsen konnten, die gar keinen Vektor enthielten. Kurz vor der Verwendung wurden die Platten jeweils mit 35 μ l X-Gal (50 mg/ml) und 20 μ l IPTG (100 mM) behandelt. Wurden gewachsene Kolonien weiterverwendet, wurde als Negativkontrolle immer zusätzlich eine blaue Kolonie mitgeführt.

5.2 Kultur eukaryotischer Zellen

5.2.1 Kultur von adhärent wachsenden Zellen

Die verwendeten HEK-293T-Zellen wuchsen als Monolayer adhärent in flach liegenden 75-ml-Flaschen. Sie wurden in 20 ml DMEM mit den vorbeschriebenen Zusätzen bei 37 °C in 7%iger CO₂-Atmosphäre im Brutschrank kultiviert. Zweimal wöchentlich wurden die Zellen subkultiviert.

Dazu wurde das Medium unter sterilen Bedingungen abgenommen, der Zellrasen mit PBS gespült und durch kurzes Andauen mit 2 ml Trypsin-EDTA bei 37 °C in 7%iger CO₂-Atmosphäre abgelöst. Anschließend wurden die Zellen mit DMEM verdünnt, wobei durch das enthaltene FKS auch das Trypsin inaktiviert wird. $\frac{1}{10}$ der Zellsuspension wurde in eine neue Zellkulturflasche übertragen und mit DMEM wieder auf 20 ml aufgefüllt.

5.2.2 Transfektion eukaryotischer Zellen

mit dem Transfektionsreagenz Nanofectin™

Das von PAA Laboratories angebotene Transfektionsreagenz Nanofectin™ zeichnet sich durch eine hohe Transfektionseffizienz bei geringer Zytotoxizität aus. Es besteht aus einem positiv geladenen Polymer, der in poröse Nanopartikel eingebettet ist. An das Polymer bindet die aufgrund ihrer Phosphatreste negativ geladene DNA und wird per Endozytose zusammen mit dem Nanopartikel von der Zelle aufgenommen. In der Zelle ist sie laut Hersteller durch die Komplexbildung mit dem Nanopartikel vor Abbau geschützt.

Für die Transfektion wurden die adhärent wachsenden Zellen am Vortag auf 24-Loch-Platten ausgesät, so dass sie am Tag darauf zu mindestens 60% konfluent waren. Pro Ansatz wurden 1-1,2 µg DNA und 3,2 µl Nanofectin™ jeweils mit 50 µl steriler NaCl-Lösung (150mM) gemischt. Anschließend wurde beides vermischt, so dass jeder Ansatz 100 µl Volumen hatte, und für 15-30 min bei RT inkubiert. Während dieser Zeit bildete die DNA den Komplex mit den Nanopartikeln, im

Anschluss wurden die Ansätze in jeweils 1 Loch der Platte tropfenweise auf die Zellen gegeben. Durch vorsichtiges Bewegen der Platte in der Ebene wurden Medium und zugefügte Ansätze in den einzelnen Löchern gemischt und die Platte für 48 h im Brutschrank inkubiert.

5.2.3 Zellzahlbestimmung mit dem CASY® Cell Counter

Beim Aussäen von Zellen war eine Kenntnis der Zelldichte erforderlich, um für die spätere Transfektion ein günstiges Maß an konfluentem Wachstum zu erreichen. Das Zellanalysegerät CASY® Cell Counter misst gleichzeitig Anzahl und Größe von Mikropartikeln in einem definierten Elektrolyten und gibt das Ergebnis als Histogramm aus. Dies funktioniert durch Messung des elektrischen Widerstands im Elektrolyten, der dazu durch eine im Gerät befindliche Kapillare geleitet wird. Der Widerstand ändert sich immer dann, wenn ein im Elektrolyten enthaltener Partikel, z.B. eine Zelle oder ein Zelltrümmer die Kapillare passiert. Da eine Zelle einen elektrischen Isolator darstellt, erhöht sich der gemessene Widerstand in Abhängigkeit ihrer Größe. Tote Zellen, bei denen die Membran keine elektrische Barriere darstellt, bewirken eine geringere Widerstandserhöhung und werden mit der Größe ihres Kerns erfasst (Zitzler, 2004).

Für die Messung wurden die Zellen der Suspension vereinzelt und eine Menge von 6 µl in 6 ml CASY®ton gegeben. Dieser Elektrolyt besitzt physiologischen pH und ist isoton, da sich andernfalls die Größe der Zellen durch Anschwellen oder Schrumpfen verändern könnte. In dem ausgegebenen Histogramm wurde die Grenze von 9,6 µm Durchmesser festgelegt, ab der Partikel als lebende Zellen gedeutet werden sollten, und erhielt daraufhin die Zelldichte pro ml.

5.3 DNA-Techniken

5.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) werden in vitro selektiv DNA-Abschnitte aus einem Gemisch von Nukleinsäurenmolekülen enzymatisch amplifiziert. Vermehrt werden diejenigen Abschnitte, die von zwei künstlichen, spezifisch synthetisierten Oligonukleotiden (Primern) eingerahmt werden. Die beiden Primer müssen jeweils komplementär an einen der zwei Einzelstränge der Vorlagen-DNA (Template) binden, weshalb die Sequenz des Templates zumindest in diesen Bereichen bekannt sein muss. Die Anreicherung kann von sehr geringen Mengen ausgehen, indem der aus verschiedenen Einzelschritten bestehende Vorgang ausreichend oft wiederholt wird.

Die automatisiert im Thermocycler ablaufenden Einzelschritte sind in der Tabelle 2 beschrieben:

Tabelle 2: Einzelschritte eines PCR-Zyklus

Schritt	Vorgang	verursacht durch	Voraussetzung
1. Melting	Auftrennung (Denaturierung) der doppelsträngigen DNA in Einzelstränge	Erhitzen über den Schmelzpunkt der DNA (etwa 95 °C)	
2. Annealing	Anlagerung der Primer	Abkühlung unter den Schmelzpunkt der Primer, der von ihrer Länge und dem GC-Gehalt abhängt, üblicherweise verwendet man den	beide Primer müssen in hohem Überschuss vorhanden sein

		Mittelwert beider Schmelzpunkte (meist zwischen 51 und 65 °C)	
3. Elongation	Synthese des jeweiligen Komplementärstrangs	DNA-Polymerase bei der für sie optimalen Temperatur (72 °C)	genügend dNTPs müssen vorhanden sein

Bei jeder Wiederholung des Zyklus steht als Vorlage zusätzlich die im vorausgegangenen Zyklus neu gebildete DNA zur Verfügung, weshalb die Vermehrung zunächst exponentiell verläuft. Mit wachsender DNA-Konzentration verschlechtern sich allerdings die Reaktionsbedingungen, der Überschuss an Primern und Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) verringert sich und die Enzymaktivität lässt nach. Die DNA-Menge steigt dann nicht mehr wesentlich, weshalb man die Reaktion üblicherweise nicht mehr als 20-40 Mal wiederholt.

Das hohe Temperaturoptimum der Polymerase erklärt sich mit ihrer Herkunft aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* (Taq), das in heißen Quellen und Geysiren lebt. Die Thermostabilität ist erforderlich, damit das Enzym trotz der hohen Temperatur beim Melting nicht zerstört wird. In Ausnahmefällen musste anstelle der Taq-Polymerase eine andere hitzestabile Polymerase verwendet werden. Diese Phusion[®]-High-Fidelity-Polymerase besaß eine besonders niedrige Fehlerrate bei der Elongation.

Um auszuschließen, dass der Reaktionsansatz Kontaminationen unerwünschter DNA enthält, wurde als Negativkontrolle ein identischer Ansatz mitgeführt, dem allerdings die Template-DNA fehlte. Nachdem das Programm durchgelaufen war, wurde das Ergebnis geprüft, indem beide Ansätze elektrophoretisch dargestellt und bei Erfolg die gewünschte Bande vorgefunden wurde.

Alle Ansätze wurden auf Eis pipettiert und die Taq-Polymerase jeweils als letztes hinzugegeben. Ein typischer PCR-Ansatz ist in Tabelle 3 aufgeführt und ein entsprechendes Programm in Tabelle 4 zu sehen. Die abschließende Extension sollte

der Fertigstellung nicht abgeschlossener Replikationen an noch als Einzelstrang vorliegenden DNA-Molekülen dienen.

Verwendete Reagenzien:

Thermus-aquaticus-(Taq-)Polymerase:	5 U/ μ l	
Phusion®-High-Fidelity-Polymerase:	2 U/ μ l	
10fach-(Taq-Polymerase-)Reaktionspuffer:	KCl	500 mM
	Tris-HCl, pH 8,3	100 mM
	Gelatine	1 mg/ml
	MgCl ₂	25 mM

5fach-Phusion®-HF-Puffer

DMSO (optional)

dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP): 10 mM (gesamt)

Tabelle 3: Pipettierschema eines Standard-PCR-Ansatzes

Komponente	Menge bzw. Volumen	Endkonzentration
Template-DNA	0,1-1 μ g	
Taq-Polymerase	0,5 μ l	2,5 U
10fach-Reaktionspuffer	10 μ l	1fach
5'-Primer	25 pmol	250 nM
3'-Primer	25 pmol	250 nM
dNTPs	1 μ l	100 μ M (je 25 μ M)
DMSO (optional)	4 μ l (optional)	
H₂O_{bidest}	ad 100 μ l	

Tabelle 4: Programm einer Standard-PCR

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer
Melting	95 °C	2 min
1. Melting	95 °C	1 min
2. Annealing	z.B. 58 °C	1 min
3. Extension	72 °C	z.B. 1 min
abschließende Extension	72 °C	10 min
Kühlung nach Abschluss	4 °C	bis zur Entnahme der Proben

5.3.2 Agarosegelelektrophorese

(Sambrook & Russel, 2001a)

5.3.2.1 Agarosegelelektrophorese doppelsträngiger DNA

Die Agarosegelelektrophorese dient dazu, DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufzutrennen und sichtbar zu machen.

Die Auftrennung erfolgt, da die DNA ein Agarosegel je nach ihrer Größe und Konformation unterschiedlich schnell durchwandert. Wandern tut sie, da sie wegen der Phosphatreste ihres Zucker-Phosphat-Gerüsts negativ geladen ist und sich im elektrischen Feld in Richtung Anode bewegt. Je nach Agarosekonzentration des Gels wird die DNA unterschiedlich stark gebremst, so dass mit verschiedenen konzentrierten Gelen jeweils andere DNA-Größenbereiche optimal aufgetrennt werden können. Je konzentrierter das Gel, desto kürzere DNA-Stücke werden getrennt. Zusätzlich variiert werden können Stromstärke und angelegte Spannung.

Sichtbar gemacht wird die DNA unter UV-Licht. Da das Gel den Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid, der mit doppelsträngiger DNA interkaliert, enthält, sieht man überall, wo sich eine Lauffront aus mehreren ähnlich großen DNA-Molekülen befindet, eine orange fluoreszierende Bande.

Während des Vorgangs befindet sich das Gel in einer mit TAE-Puffer gefüllten Elektrophoresekammer. Damit sich die DNA dort nicht im ganzen Becken verteilt, sondern durch das Gel wandert, muss sie in die Geltaschen absinken. Dazu mischt man die Probe zu $\frac{1}{5}$ ihres Volumens mit einem Stopp-Lade-Mix, der Glycerin enthält und daher schwerer als die Pufferlösung ist. Außerdem stoppt er unerwünschte Reaktionen ab, falls in der Probe Enzyme vorhanden sind. Hierfür entzieht er diesen die benötigten zweiwertigen Kationen mittels EDTA, das die Kationen komplexiert. Weiterhin enthält er den Farbstoff Bromphenolblau, weshalb man ihn auch Blaumarker nennt und die vorderste Lauffront der Probe auch ohne UV-Licht sehen kann.

Um den einzelnen Banden später die ihrer Laufstrecke entsprechende Größe zuordnen zu können, lässt man zum Größenvergleich ein Gemisch von verschiedenen DNA-Fragmenten bekannter Länge und Konzentration mitlaufen. Durch Vergleich mit dem von ihm erzeugten Bandenmuster kann man die Länge der DNA-Fragmente in den Proben bestimmen.

Die Auftrennung erfolgte über einen Zeitraum von 45-70 min bei einer angelegten Spannung von 100-140 V und 400 A, wobei das Gel vollständig mit Puffer bedeckt war. Mitlaufender Größenmarker war die 1 Kb plus DNA ladder™ von Invitrogen. Die Darstellung und Dokumentation der Banden erfolgte mit kurzwelligem UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$) (Geldokumentationssystem MWG Biotech Gel Print 2000i), das die DNA allerdings so stark schädigt, dass sie für weiteres Arbeiten unbrauchbar wird. Daher wurden Banden, deren DNA isoliert und weiterverwendet werden sollte, vorher unter langwelligem UV-Licht ($\lambda = 366 \text{ nm}$) ausgeschnitten.

5.3.2.2 Herstellung eines Agarosegels

Abhängig von der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente kann man Agarosegele mit unterschiedlichen Konzentrationen zwischen 0,6 und 2,0% (w/v) herstellen. Die entsprechende Agarosemenge wurde in 450 ml TAE-Puffer 1fach durch Aufkochen im Mikrowellenherd (ca. 5 min bei 750 W) gelöst und nach

Abkühlen auf ca. 60 °C mit 26 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml in H₂O) versetzt. Anschließend wurde die Agaroselösung auf Glasplatten mit Kunststoffeinfassung (24,5 × 24,5 × 1 cm), die vorher mit 1%iger Agarose abgedichtet wurde, gegossen. Durch an dem Kunststoffrahmen befestigte PVC-Kämme wurden im Gel Probetaschen ausgespart, die beim erkalteten Gel ca. 35 µl Fassungsvermögen hatten. Nach vollständiger Polymerisation des Gels wurden die Kämme entfernt, das Gel in Klarsichtfolie verpackt und bis zum Gebrauch bei 4 °C gelagert.

Tabelle 5: Ideale Agarosekonzentrationen für bestimmte DNA-Trennbereiche

Agarosemenge (%)	DNA-Trennbereich (kbp)
0,3	60-50
0,6	20-1
0,7	10-0,8
0,9	7-0,5
1,2	6-0,4
1,5	4-0,2
2,0	3-0,1

5.3.2.3 DNA-Isolierung aus Agarosegelen

(Vogelstein & Gillespie, 1979)

Um DNA bestimmter bei der Elektrophorese entstandener Banden zu reisolieren, wurde die Eigenschaft von DNA genutzt, bei Anwesenheit hoher Konzentrationen chaotroper Salze wie z.B. Natriumjodid an Silikate, z.B. in Form von Glasmilch zu binden. Dieser Vorgang ist reversibel, indem man durch Waschen die Salzkonzentration senkt und dabei die DNA eluiert. Von Vorteil ist, dass das Natriumjodid außerdem das Agarosegel auflöst.

Die Methode ist nicht geeignet für DNA-Fragmente, die kleiner als 100 bp sind, da diese so fest an die Glasmilch binden, dass sie kaum noch eluiert werden, sowie

Fragmente größer als 5 kbp, die durch die auftretenden Scherkräfte zerstört werden können.

Das unter langwelligem UV-Licht ($\lambda = 366 \text{ nm}$) mit einem Skalpell ausgeschnittene Gelstück, das die gewünschte Bande enthielt, wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und das dreifache Volumen 6 M NaI-Lösung zugegeben. Wenn sich das Gelstück bei 55 °C nach ca. 10 min aufgelöst hatte, wurden je nach erwarteter DNA-Menge 10-20 µl Glasmilch hinzugefügt und vorsichtig gevortext. Anschließend wurde das Gemisch für mindestens 30 min bei Raumtemperatur auf einem Überkopfrotator inkubiert, um die DNA an die Glasmilch binden zu lassen.

Zur Sedimentation der Glasmilch wurde der Ansatz 1 min lang bei 13 000 rpm abzentrifugiert (Sigma 202 MK) und der Überstand verworfen. Das Glasmilchpellet wurde dreimal jeweils mit 500 µl NEW-Wash®-Lösung (Gene-Clean®-Kit von Qiogene) gewaschen und 1 min bei 13 000 rpm abzentrifugiert.

Zur Elution wurde das gewaschene Pellet in 20 µl wahlweise H₂O oder TE-Puffer resuspendiert, der Ansatz für 10 min bei 55 °C inkubiert und anschließend erneut 1 min lang bei 13 000 rpm abzentrifugiert. Der DNA-enthaltende Überstand wurde abgenommen und das Pellet verworfen. Ein Teil des Überstands wurde zur Prüfung des Erfolgs elektrophoretisch dargestellt.

5.3.3 Isolierung von Plasmid-DNA

5.3.3.1 Analytische DNA-Isolierung aus Bakterien

(Mülhardt, 2006)

Bei der analytischen Isolierung soll von verschiedenen Klonen eine kleine Menge DNA gewonnen werden, um mit dieser zu prüfen, ob ein Klon den gewünschten Vektor enthält. Dafür ist es wichtig, möglichst viele Ansätze mit vertretbarem Aufwand bearbeiteten zu können, während die Reinheit der DNA lediglich für den nachfolgenden Restriktionsverdau ausreichend sein muss.

Verwendet wurde die Boiling-Methode, bei der die Zellen mit Lysozym lysiert, die Proteine durch Kochen denaturiert und die Nukleinsäuren mit Isopropanol gefällt werden.

Von Ansätzen mit je 2,5 ml LB-Medium, die mit Einzelkolonien beimpft und über Nacht bei 37 °C auf einem Schüttler aerob inkubiert worden waren, wurden jeweils 1,5 ml Bakteriensuspension entnommen und verwendet. Die einzelnen Volumina wurden 5 min lang bei 5 000 rpm (Sigma 202 MK) und 4 °C abzentrifugiert und das entstandene Zellsediment in 200 µl STET-Puffer mit Lysozym (0,25 mg/ml) resuspendiert. Nach anschließendem Denaturieren im Wasserbad bei 98,5 °C für 30-45 s wurden die Ansätze kurz auf Eis gekühlt und erneut zentrifugiert (15 min, 12 000 rpm, 4 °C). Das entstandene, von den unerwünschten Zellresten gebildete Pellet wurde mit einem sterilen Zahnstocher entnommen und der verbleibende Überstand auf Eis weiterverarbeitet. Zum Fällern der DNA wurden 200 µl Isopropanol hinzugegeben und bei 14 000 rpm und 4 °C für 45 min zentrifugiert. Das aus den Nukleinsäuren bestehende Pellet wurde vorsichtig mit 150 µl 70%igem eiskalten Ethanol gewaschen, um noch vorhandene Salze zu entfernen, und kurz abzentrifugiert (14.000, 4 °C). Der Ethanol wurde abgenommen, das Pellet an der Luft getrocknet und je nach Größe in 15-20 µl Resuspensionspuffer S1 (Macherey-Nagel) gelöst. Dieser Puffer enthielt RNase A, die im letzten Schritt während 10-minütiger Inkubation bei 37 °C die RNA in der Lösung verdauen sollte. Die DNA konnte sofort verwendet oder bei 4 °C gelagert werden.

5.3.3.2 Präparative Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

(Birnboim & Doly, 1979; Mülhardt, 2006)

Im Gegensatz zur analytischen sind bei der präparativen DNA-Isolierung Ausbeute und Reinheit der DNA am wichtigsten. Daher bietet sich als Verfahren zur Zerstörung der Zellwand die alkalische Lyse an, bei der die unerwünschte chromosomale DNA besonders effektiv entfernt wird. Der stark alkalische pH denaturiert die DNA der Bakterien, von der dann nach der Neutralisation nur die

Plasmid-DNA wieder hybridisiert, während die weit größere chromosomale DNA einzelsträngig bleibt und ausfällt.

Verwendet wurde das Nucleobond[®]-Kit der Firma Marcherey-Nagel. Mit ihm wurden die unerwünschten Zellbestandteile entfernt und die DNA durch Ionenaustauscherchromatographie gewonnen. Hierfür werden abhängig von der Größe der Präparation unterschiedliche Nucleobond[®]-AX-Säulen geliefert, die als Anionenaustauscher ein Silikat enthalten. Üblicherweise wurden Midipräparationen durchgeführt, bei denen mit AX-100-Säulen gut 100 ml einer Übernachtskultur verarbeitet wurden.

Die Bakteriensuspension wurde bei 4 °C und 4 000 rpm (Heraeus Megafuge 1,0 RF) 15 min lang abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Bakteriensediment mit 4 ml Resuspensionspuffer S1 gemischt. Nach Hinzufügen von 4 ml Lysepuffer S2 wurde erneut, aber besonders vorsichtig und nur durch mehrmaliges Schwenken über Kopf gemischt und für 2-3 min auf Eis inkubiert. In diesem Schritt erfolgte die Lyse der Bakterien und das Denaturieren der Zellbestandteile. Im Anschluss wurden sofort 4 ml Neutralisationspuffer S3 hinzugefügt, durch über Kopf schwenken gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Nach dieser Behandlung präzipitierte die chromosomale DNA und der Ansatz wurde für 25 min bei 4 °C mit 6 000 rpm zentrifugiert. Während dieser Zeit konnte die AX-100-Säule mit 2,5 ml Äquilibrationpuffer N2 vorbereitet sowie ein mit demgleichen Puffer befeuchteter Filter aufgesetzt werden. Auf diesen wurde der Überstand des Ansatzes gegossen und abgewartet, bis die gesamte Flüssigkeit durch die Säule gelaufen war. Bei der Passage bindet die DNA an das äquilibrierte Ionenaustauschermaterial in der Säule und wird zurückgehalten. Nach Entfernung des Filters und Waschen der Säule mit 2*5 ml Waschpuffer N3 wurde die Säule auf ein frisches Falcon gesetzt und die DNA mittels 5 ml Elutionspuffer N5 in das Gefäß überführt. Dort wurde sie mit 3,6 ml Isopropanol gemischt und dadurch gefällt. Durch 1-2 h Zentrifugation bei 4 °C mit 6 000 rpm wurde ein Pellet erzeugt, dem nach Abgießen des Überstandes 2 ml eiskalter 70%iger Ethanol hinzugefügt wurde. Nach diesem Waschschrift wurde 10 min bei RT mit 6 000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgegossen und das Pellet im über

Kopf auf Papier stehenden Falcon trocknen gelassen. Anschließend wurde es in 100 μl sterilem $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ aufgenommen und bei 4 °C über Nacht gelöst.

Ausbeute und Reinheit der gewonnenen DNA wurden photometrisch ermittelt, die Lösung mit sterilem $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ auf 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ verdünnt und ein Kontrollverdau durchgeführt.

5.3.4 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration gelöster DNA wurde photometrisch bestimmt. Dazu wird die Extinktion von Licht in der jeweiligen Lösung gemessen und die Konzentration automatisiert über das Lambert-Beer-Gesetz errechnet.

Die Wellenlänge des verwendeten Lichts betrug 260 nm, da es dann von Nukleinsäuren maximal absorbiert wird. Eine optische Dichte (OD) von 1,0 bei $\lambda = 260$ nm entspricht bei doppelsträngiger DNA einer Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, einzelsträngiger DNA und RNA einer Konzentration von 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Zur Quantifizierung von Verunreinigungen wurde die OD bei 280 nm gemessen, dem Absorptionsmaximum der meisten Proteine und damit der mengenmäßig bedeutsamsten Verunreinigungen. Der Quotient der Extinktionen bei 260 und 280 nm stellt dadurch ein Maß für die Reinheit der Nukleinsäurelösung dar. Bei reinen DNA-Lösungen liegt er zwischen 1,8 und 2,0 (Sambrook & Russel, 2001b). Tiefere Werte sind ein Hinweis auf Verunreinigungen mit Proteinen oder Phenolresten, höhere Werte zeigen größere Mengen an RNA an. Für die Messung wurden 4 μl DNA-Lösung 1:100 mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ verdünnt und die OD_{260} sowie OD_{280} in einem Ultraspec-3000-Photometer (Pharmacia Biotech) gemessen. Als Referenz diente $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$.

5.3.5 Enzymatische Modifikation von DNA

5.3.5.1 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

(Sambrook & Russel, 2001a; Mülhardt, 2006)

Doppelsträngige DNA kann von Restriktionsendonukleasen hoch sequenzspezifisch geschnitten werden. Natürlicherweise passiert das in Bakterien, die durch diesen Abwehrmechanismus von Phagen eingeschleuste Fremd-DNA verdauen. Die Restriktionsenzyme funktionieren jedoch genauso *in vitro* und finden vielfältige gentechnische Anwendung. Es sind so viele bekannt, dass eine systematische Nomenklatur verwendet wird. Die ersten drei Buchstaben werden üblicherweise kursiv gesetzt und bestehen aus dem Anfangsbuchstaben der Gattung und den ersten zwei Buchstaben des Artnamens des Bakteriums, aus dem das Enzym isoliert wurde. Dahinter setzt man, nicht kursiv gesetzt, die Bezeichnung des Stamms oder Typs und die Ordnungsnummer des daraus isolierten Restriktionsenzym in lateinischen Ziffern. So ist z.B. *EcoR* I die erste Restriktionsendonuklease aus dem R-Stamm von *E. coli* (Yoshimori *et al.*, 1972).

Jedes Restriktionsenzym erkennt eine charakteristische Sequenz auf der DNA, die 4-8 Basenpaare umfasst, häufig ein Palindrom ist und in der Regel die Schnittstelle selbst enthält. Je nachdem, ob die DNA zwischen direkt gegenüberliegenden oder versetzt stehenden Basen geschnitten wird, können glatte Enden oder Enden, bei denen ein Strang den anderen überragt, resultieren. Entsteht ein Überhang, so ist ein 5'-Überhang für nachfolgende Klonierungen günstiger, da hier die Phosphatgruppe, die sich immer am 5'-Ende befindet, besser zugänglich ist als bei einem 3'-Überhang. Die Menge der Restriktionsenzyme wird in Units angegeben. Ein Unit (U) ist die Menge Enzym, die 1 µg DNA bei optimalen Bedingungen innerhalb von 60 min vollständig schneidet.

In den Verdauansätzen wurden für analytische Zwecke 0,5-1 µg DNA und für präparative Zwecke bis zu 4 µg DNA verwendet. Da die Enzyme in Relation zu der Zeit, die sie zum Schneiden brauchen, unterschiedlich lange stabil bleiben, benötigte

von jedem Enzym andere Mengen. Üblich waren 2-10 U/ μ g DNA, wobei das Volumen an zugesetztem Enzym wegen des in der Enzymlösung als Frostschutz vorhandenen Glycerols $\frac{1}{10}$ des Reaktionsansatzes nicht überschreiten durfte. Eine Glycerolkonzentration von über 5% des Gesamtvolumens könnte eine Staraktivität des Enzyms zur Folge haben und die DNA würde unspezifisch fragmentiert.

Der Verdau wurde jeweils bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur und Inkubationsdauer sowie mit den mitgelieferten 10fach konzentrierten Puffern durchgeführt. Wenn benötigt, wurde dem Ansatz BSA zugesetzt, in dessen Anwesenheit viele Restriktionsenzyme eine höhere Aktivität zeigen. Wenn mit zwei verschiedenen Enzymen geschnitten werden sollte und es das geforderte Puffermilieu zuließ, wurde der Verdau mit beiden Enzymen in einem Ansatz durchgeführt. Hierbei wurden die Empfehlungen des Herstellers berücksichtigt, insbesondere beim Doppelverdau mit *EcoR* I und *BamH* 1 wurde zur Vermeidung von Staraktivität der *EcoRI*-Puffer verwendet.

Sollten PCR-Produkte geschnitten werden, bei denen wegen des geringen Größenunterschieds zwischen verdauter und unverdauter DNA eine Erfolgskontrolle mittels Agarosegel nicht möglich war, wurde der Ansatz sicherheitshalber über Nacht verdaut.

5.3.5.2 Dephosphorylierung von Vektor-DNA-Enden

(Bolivar *et al.*, 1992; Chaconas & van de Sande, 1980; Mülhardt, 2006)

Damit ein linearisierter Vektor nicht rezirkularisieren, oder, falls er mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten wurde, zumindest nicht konkatemerisieren kann, wird er vor der Ligation mit dem Insert dephosphoryliert. Dies geschieht mittels der alkalischen Phosphatase (calf intestinal phosphatase, CIP), einem Enzym, das aus Kälberdarm gewonnen wird. Die Phosphatase spaltet die reaktive Phosphatgruppe vom 5'-Überhang des DNA-Endes ab, wodurch Enden des Vektors nicht mehr aneinanderbinden, eine Ligation mit einem Insert, das nicht dephosphoryliert ist, aber weiterhin möglich ist.

Ein Standardreaktionsansatz enthielt 20 µl der verdauten Vektor-DNA, 1 µl CIP und 3 µl mitgelieferten 10fach Reaktionspuffer und wurde mit 6 µl H₂O_{bidest} auf 30 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Er wurde für 2 h oder über Nacht bei 37 °C inkubiert, die DNA anschließend auf einem Agarosegel aufgetrennt und mit Glasmilch reisoliert. Dieses Vorgehen entfernte außerdem die sehr stabile CIP, die andernfalls bei der nachfolgenden Ligation durch Dephosphorylierung des Inserts das Ligieren vereiteln könnte.

5.3.5.3 Ligation von DNA-Fragmenten

(Sgaramella *et al.*, 1970; Dugaiczky *et al.*, 1975)

Bei einer Ligation werden zwei Nukleinsäuremoleküle mittels einer Ligase, die eine Esterbindung zwischen dem 3'-Hydroxy- und dem 5'-Phosphatende knüpft, *in vitro* miteinander verbunden. Die Enden der Nukleinsäuremoleküle müssen dafür kompatibel sein, d.h. mindestens ein Ende muss eine 5'-Phosphatgruppe tragen und beide Enden müssen komplementär zueinander sein. Die eine Nukleinsäure ist in der Regel ein Vektor und die andere ein Insert, das in den Vektor eingebracht werden soll. Als Ligase wird häufig die T4-DNA-Ligase verwendet, die aus *E.-coli*-Bakterien, die mit dem T4-Phagen infiziert sind, stammt und als Cofaktor ATP benötigt.

Die Ligase verknüpft allerdings kompatible Enden nicht nur in der gewünschten Konstellation „ein Insert in einen Vektor“, sondern auch mehrere Inserts miteinander oder solche verbundenen Inserts zusammen in einen Vektor. Bei nicht ausreichend dephosphorylierten Vektorenden sind sogar noch mehr ungünstige Verbindungen möglich, wie rezirkularisierte oder in Serie geschaltete Vektoren. Für die Bildung erwünschter Ligationsprodukte ist daher das Mengenverhältnis beider DNAs äußerst wichtig, da es die Wahrscheinlichkeit bestimmt, dass zwei zufällig verknüpfte Enden tatsächlich füreinander bestimmt waren. Die Volumina wurden daher individuell abhängig von der anhand eines Probegels geschätzten DNA-Menge festgelegt. Ein Reaktionsansatz bestand aus den beiden DNA-Mengen, 1 µl T4-DNA-Ligase und den Volumina an 10fach-T4-Ligase-Puffer und H₂O_{bidest}, dass der

Puffer im Gesamtvolumen von 10 oder 20 µl 1fach konzentriert war. Abweichend hiervon wurde bei der Klonierung von PCR-Produkten ohne vorherigen Restriktionsverdau der TA-Klonierungsvektor pGEM[®]-T aus dem pGEM[®]-T-Vektor-Kit von Promega nebst mitgelieferter Ligase und Puffer verwendet.

Ligationsansätze wurden für 2 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C inkubiert und anschließend zur Hälfte zur Transformation kompetenter Bakterien eingesetzt. Die andere Hälfte wurde als Sicherheit für eventuell notwendige Wiederholungsschritte bei 4 °C gelagert.

Zu jeder Ligation wurde als Überprüfung der Dephosphorylierung eine Kontrolle mit dem Vektor ohne Insert mitgeführt. Das Wachstum von Transformanten wäre dann eine Folge von Vektorrezirkularisierung und damit ein Beweis mangelnder Dephosphorylierung. Zusätzlich wurde eine Transformationskontrolle durchgeführt mit einem zirkulären Vektor, der den Bakterien nach erfolgreicher Transformation die notwendige Antibiotika-Resistenz verleiht. Bakterienwachstum galt hier als Nachweis für eine erfolgreiche Transformation.

10fach-T4-Ligase-Puffer	ATP	10 mM
	MgCl ₂	50 mM
	DTT	10 mM
	Tris/HCl (pH 7,5)	660 mM

5.3.6 DNA-Sequenzierungen

Bevor die hergestellten Vektorkonstrukte für Experimente verwendet wurden, wurde mittels vollständiger Sequenzierung der entscheidenden Bereiche ausgeschlossen, dass es bei der PCR oder Klonierung zu unerwünschten Mutationen gekommen war. Dazu wurden das Angebot von GATC Biotech in Konstanz und der Sequenzierservice von Dr. Rolf Klein am Institut für Immunologie und Genetik am Klinikum in Kaiserslautern genutzt. Beide Unternehmen verwenden ein Verfahren, bei dem die DNA mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert wird, die während der Elektrophorese mittels Laser angeregt und gemessen werden. Sie lieferten neben dem

Sequenzierungsergebnis auch die zugrundeliegenden Chromatogramm-Rohdaten. Der Abgleich des Ergebnisses mit der gewünschten Sequenz erfolgte mit dem Werkzeug BLAST (basic local alignment search tool) auf der Homepage von NCBI. Abweichungen wurden im Chromatogramm mittels GATCViewerTM überprüft.

5.4 Der Luciferase-Reportergen-Assay

(Cullen, 1987)

Mit dem Luciferase-Reportergen-Assay werden regulatorische Einflüsse auf die Genexpression mit Hilfe eines Vektorkonstrukts, das für eine Luciferase kodiert, untersucht. Luciferasen sind Enzyme, die die Oxidation ihres Substrats Luciferin katalysieren, wobei sichtbares Licht entsteht. Sie kommen in der Natur in verschiedensten biolumineszenten Organismen vor, z.B. in Insekten, Pilzen, Bakterien, Tiefseefischen und anderen marinen Lebewesen.

Die Luciferase des verwendeten Reportervektors pGL3-Promoter stammt ursprünglich aus dem Glühwürmchen *Photinus pyralis*. Sie benötigt keine posttranslationale Modifikation zum Erreichen ihrer Aktivität und benutzt als Cofaktor ATP.

In den Reportervektor wird eine untranslatierte Region (UTR) des Gens, dessen Regulation untersucht werden soll, einkloniert. Die Klonierung erfolgt so, dass die UTR in gleichem Bezug zum offenen Leserahmen (ORF) der Luciferase steht, wie zum ORF des Gens, aus dem sie ursprünglich stammt. Dabei werden die Leserichtung und die Situation, ob sie dem 5'-Ende vor- oder dem 3'-Ende nachgeschaltet war, berücksichtigt. Dadurch unterliegt die Luciferaseexpression den gleichen Beeinflussungsmechanismen durch die UTR wie die Expression des Gens, das diese UTR normalerweise enthält. Die Luciferasemenge kann dann als indirektes Maß für seine Expression dienen.

Der Vorteil des Konstrukts besteht darin, dass die Luciferaseaktivität leicht messbar ist, was man von der Expression vieler Gene, deren Regulation man untersucht, nicht sagen kann. Die Lichtproduktion wird in einem Luminometer gemessen und kann, da

sie proportional zur vorhandenen Luciferasemenge ist, quantitativ ausgewertet werden.

Die eukaryotischen Zellen wurden in 24-Loch Platten ausgesät und am Folgetag mit den jeweiligen Reporter- und Effektorkonstrukten transfiziert. Die Reporter waren pGL3-Promoter-Konstrukte mit einklonierten 3'-UTRs, die Effektoren pSG5-Konstrukte, die die miRNAs exprimierten, deren Einfluss auf die 3'-UTR von Interesse war. Zusätzlich wurde ein pEGFP-C1-Vektor kotransfiziert, der das grün fluoreszierende Protein EGFP exprimiert. Dadurch konnte später im FACS durch Messung der grünen Fluoreszenz die Transfektionseffizienz bestimmt werden.

Für einen typischen Ansatz wurden jeweils 0,2 µg Reporter-, 0,8 µg Effektor- und 0,2 µg pEGFP-C1-DNA verwendet. Die Gesamtmenge an DNA für jeden Ansatz betrug damit 1,2 µg. Jedes Experiment, das aus bis zu 12 Doppelansätzen bestand, enthielt einen zusätzlichen Kontrollansatz, der nicht mit Plasmiden, sondern mit 1,2 µg DNA aus Heringssperma transfiziert wurde. Diese Zellen fungierten später bei der FACS-Analyse als Referenzpopulation für die Differenzierung zwischen lebenden und toten Zellen.

48 h nach Transfektion wurden die Zellen abtrypsinisiert, in 900 µl Medium aufgenommen, bei 1200 rpm (Sigma 202 MK) 10 min lang abzentrifugiert und in 500 µl PBS-Puffer ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} aufgenommen. Von der Zellsuspension wurden 100 µl für die FACS-Analyse entnommen und mit demgleichen Volumen FACS-Fixierlösung fixiert. Die restlichen Zellen wurden abzentrifugiert, kurz bei RT angetrocknet und in 100 µl CCLR-Puffer lysiert.

CCLR-Puffer (Promega) (Luciferase Cell Culture Lysis Reagent)	
Tris-Phosphat (pH 7,8)	25mM
DTT	2mM
1,2-Diaminocyclohexan-N,N,N',N'-Tetraessigsäure	2mM

Glycerol	10% (Volumen)
Triton [®] X-100	1% (Volumen)

Das Lysat wurde bei 13 000 rpm 5 min lang zentrifugiert und im Überstand die Luciferaseaktivität bestimmt. Dazu wurden von jedem Ansatz je nach Experiment 20 oder 50 µl Überstand entnommen, mit derselben Menge Luciferin aus dem Luciferase-Assay-System von Promega vermischt und sofort die Lichtemission im Luminometer gemessen.

Die gemessenen Emissionen wurden auf die mittels FACS bestimmte Transfektionsrate standardisiert und statistisch ausgewertet. Dabei wurde der in die Software Sigma Plot 10.0 integrierte t-Test für verbundene Stichproben verwendet und Abweichungen mit p-Werten < 0,05 als statistisch signifikant angesehen.

5.4.1 Interpretation der Messwerte

Bei der Testung des Einflusses der miRNAs auf die hergestellten Konstrukte musste berücksichtigt werden, dass die emittierte Lichtintensität eine sehr sensible Messgröße ist. Die Ursachen hierfür teilen sich in zwei Gruppen, denen unterschiedlich begegnet wurde.

1. Das Luminometer detektiert bereits kleinste Lichtmengen, so dass als Grundrauschen schon bei einem leeren Messröhrchen ohne enthaltene Probe ein „absoluter“ Wert gemessener „relative light units“ (RLU) ausgegeben wird, der nicht Null ist und sich bei erneuter Messung ändert. Die Messungen von Luciferase (und Luciferin) enthaltenden Ansätzen lagen dementsprechend erheblich höher (um 4-5 Größenordnungen) als von Ansätzen, die keine Luciferase enthielten und schwankten auf diesem Niveau in absoluten Zahlen ausgedrückt umso stärker.

Diese Art der Messwertstreuung ist durch die (nützliche) hohe Sensitivität des Luminometers bedingt und stellte aufgrund der späteren konfirmatorischen Statistik keinen Nachteil dar. Der verwendete t-Test berücksichtigt die

Streuung der Messungen bei seiner Bewertung der beobachteten Unterschiede.

2. Der zweiten Gruppe von Ursachen der Messwertschwankungen liegt die veränderliche Luciferaseexpression selbst zugrunde. Diese hängt keinesfalls nur (wenn überhaupt) von der getesteten miRNA, sondern von einer Vielzahl weiterer Faktoren ab. So wirkt sich beispielsweise unterschiedlich starkes Zellwachstum zwangsläufig auch auf die vorhandene Luciferasemenge aus. Solche Einflüsse konnten mit größter Sicherheit immer nur für ein ganzes Experiment konstant gehalten werden, weswegen gemessene „absolute“ RLU, auch nachdem sie auf die Transfektionsrate standardisiert worden waren, untereinander nur innerhalb desselben Experiments verglichen werden durften.

Was definitionsgemäß nicht konstant gehalten werden kann, ist die Auswirkung der in den einzelnen Ansätzen variierten Stellgröße. So wird ein mit einem Reporterkonstrukt und einem beliebigen Effektorplasmid kotransfizierter Ansatz höchstwahrscheinlich eine andere Luciferaseaktivität aufweisen als ein Ansatz, dem das Effektorplasmid fehlt. Nur, dass der Unterschied wahrscheinlich unspezifisch ist, d.h. gar nichts mit der Art des Effektors zu tun hat, sondern einzig auf die Einschleusung eines weiteren Plasmids zurückzuführen ist.

Um diese mangelnde Spezifität beobachtbarer Unterschiede zu vermeiden, wurden in jedem Experiment für jeden Ansatz geeignete Kontrollen mitgeführt. Deren Messung konnte als Maßstab für die detektierten Lichtintensitäten dienen. Beispielsweise wurden für Transfektionen mit auf pGL3 basierenden Reportergenkonstrukten parallel Ansätze mit dem pGL3-Leervektor transfiziert. Als Kontrollen für Transfektionen mit Effektorplasmiden wurden Ansätze mit einem vergleichbaren unspezifischen Effektorplasmid oder dem Leervektor verwendet.

Aus den genannten Gründen der Vergleichbarkeit wurden die Kontrollen für jedes Experiment neu erstellt, auch wenn identische Kontrollansätze schon für andere Versuchsreihen in erheblicher Menge benutzt worden waren.

Um die Ergebnisse mehrerer Experimente miteinander vergleichen zu können, mussten die „absoluten“ RLU nach ihrer Transfektionsratenbereinigung zusätzlich als relative Größe ausgedrückt werden. Dadurch wurden die Größenordnungsunterschiede der Absolutwerte, wie sie zwischen den Experimenten möglich waren, eliminiert. Der Mittelwert der beiden identischen Kontrollansätze, die keinen Effektor, sondern stattdessen den Leervektor pSG5 enthielten wurde auf 100% gesetzt. Die Durchführung aller Experimente mit doppelten Ansätzen bewirkte neben der umfangreicheren Datenerhebung, dass trotz der Verankerung des Bezugspunktes in den Messwerten, auch für die ihm zugrundeliegenden Ansätze ein Fehler angegeben werden kann. Seine Angabe ist obendrein den Fehlerangaben der anderen Ansätze gleichwertig.

5.5 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

(Heilmann, 2007)

Die Durchflusszytometrie oder FACS-Analyse (fluorescence-activated cell sorter) analysiert Einzelzellen nach Größe, Granularität, Oberflächenmerkmalen, die mit einem gekoppelten Antikörper fluoreszenzmarkiert wurden, sowie der Expression von Fluorochromen entsprechend transfizierter Zellen.

Die in Lösung befindlichen Zellen werden so durch einen Kapillare geleitet, dass sie einzeln die Messtrecke passieren. Dort werden zur Detektion der Fluoreszenzfarbstoffe diese mit Licht passender Wellenlänge angeregt und die Emission gemessen.

Größe und Granularität werden über Streulichteigenschaften ermittelt. Dazu passieren die Zellen hydrodynamisch fokussiert durch einen Hüllstrom, in den die Probenflüssigkeit injiziert wird, einen Argon-Laserstrahl ($\lambda = 488 \text{ nm}$). Dessen Licht wird von der Einzelzelle gestreut und die relative Intensität des Streulichts in zwei

Ebenen gemessen. Das Vorwärtsstreulicht (FSC, forward scatter) wird entlang der Achse des Laserstrahls gemessen und vor allem durch die Größe der Zelle beeinflusst. Das senkrecht dazu detektierte Seitwärtsstreulicht (SSC, side scatter) kommt durch Brechung oder Reflexion an Zellbestandteilen zustande und hängt stark von der Granularität der Zelle ab.

Das Gerät gibt für jedes registrierte Ereignis, dass durch eine Zelle, Zellschrott oder eine Verunreinigung verursacht sein kann, die beiden relativen Lichtintensitäten FSC und SSC aus, sowie, falls vorhanden, die vom jeweiligen Fluoreszenzfarbstoff emittierte Intensität. Diese Parameter können als Histogramm oder Punktdiagramm dargestellt und miteinander korreliert werden.

Verwendet wurde die Durchflusszytometrie, um die Transfektionsraten der Zellen in den Luciferase-Reporter-Gen-Assays (Kapitel 5.4) zu bestimmen. Dazu waren die transfizierten Zellen mit dem pEGFP-C1-Vektor kotransfiziert. Zellen, die das Plasmid besaßen, zeigten im FACS nach Anregung die entsprechende grüne Fluoreszenz. Ihr Anteil repräsentierte die Populationsgröße aller erfolgreich transfizierter Zellen. Da in den Luciferaseassays die Messwerte allerdings nur auf die Menge der lebendigen transfizierten Zellen standardisiert werden sollten (man geht davon aus, dass Zelltrümmer oder tote Zellen, auch wenn sie transfiziert waren, keinen Einfluss auf die Luciferaseaktivität in den gemessenen Zelllysatsüberständen haben), mussten die lebenden Zellen identifiziert und nur sie zur Bestimmung der Transfektionsrate herangezogen werden.

Die Festlegungen, welche Konstellationen von FSC und SSC auf eine zum Zeitpunkt der Fixierung lebendige Zelle schließen ließen, und ab welcher Fluoreszenzlichtstärke von einer transfizierten Zelle ausgegangen werden sollte, wurden für jedes Experiment individuell getroffen. Dazu wurde ein zu diesem Zweck nicht mit Plasmiden, sondern mit Heringssperma-DNA transfizierter, die Zellen des jeweiligen Experiments repräsentierender Ansatz verwendet. Anhand der Messung seiner Zellen wurden für die Zählung der transfizierten lebenden Zellen zwei Filter festgelegt:

1. In der Auftragung von SSC über FSC im Punktdiagramm (s. Abb. 12) wurde ein Gate um die abgrenzbare lebende Zellpopulation gezogen. Zellen innerhalb des Gates wiesen die für lebende Zellen typische Größe und Granularität auf, vom FACS registrierte Ereignisse außerhalb des Gates dagegen nicht.

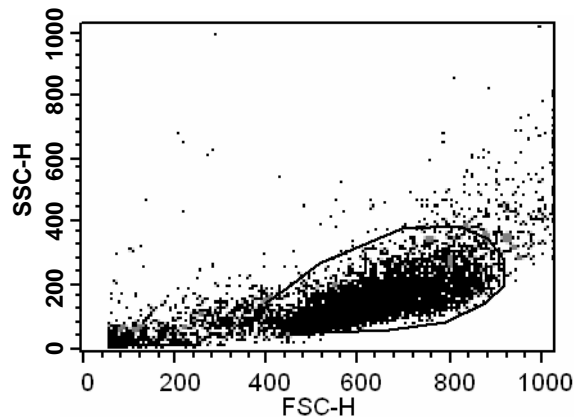


Abb. 12: Beispiel für Setzung eines Gates bei der FACS-Analyse.

Das Gate wurde um die lebende Population einer mit Heringssperma-DNA transfizierten Zellkultur gezogen.

2. In der Auftragung der Fluoreszenz über dem FSC (s. Abb. 13) wurde das Punktdiagramm in 4 Quadranten unterteilt. Durch diese Unterteilung wurde für die Zellen im rechten oberen Quadranten eine Untergrenze für die Fluoreszenzintensität definiert. Sie wurde knapp über der als Grundrauschen zu deutenden Fluoreszenz der Zellen aus dem Heringssperma-Ansatz, die kein EGFP exprimieren, gelegt. Damit wiesen alle Zellen im rechten oberen Quadranten eine stärkere Fluoreszenz auf, als Zellen, die den pEGFP-C1-Vektor nicht enthalten, ergo waren sie transfiziert.

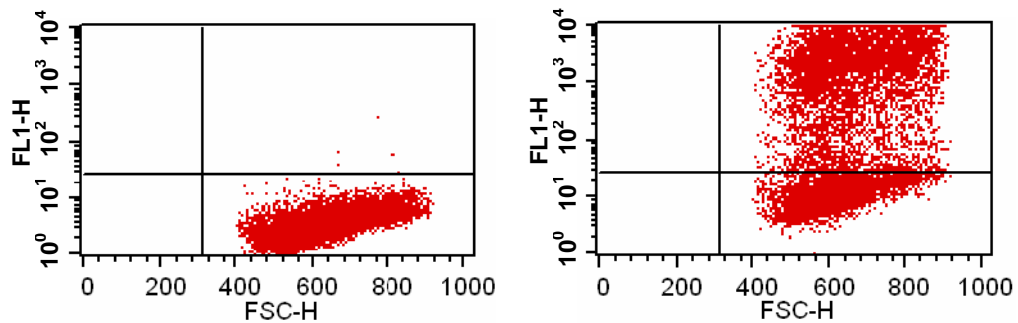


Abb. 13: Differenzierung der Zellen im FACS nach ihrer Fluoreszenz

Das linke Punktdiagramm zeigt die lebende Subpopulation der nicht EGFP-exprimierenden Zellen des mit Heringssperma-DNA transfizierten Ansatzes. Die Quadranten wurden so gesetzt, dass alle Zellen bis auf wenige Ausreißer im rechts-unteren Quadranten liegen. Im rechten Diagramm sieht man einen der üblichen mit dem pEGFP-C1-Vektor kotransfizierten Ansätze desselben Experiments. Auch hier sind nur die lebenden Zellen erfasst. Die über dem Cutoff liegenden Punkte entsprechen transfizierten Zellen, die darunter liegenden waren nicht transfiziert.

Die Setzung der Gates lässt einen gewissen Spielraum. Wie bei jeder Festlegung von Ein- oder Ausschlusskriterien, muss man einen Mittelweg zwischen möglichst hoher Sensitivität und Spezifität finden. Zum Beispiel könnte ein bezüglich der Zellgröße zu eng gesetztes Gate einige Zellen, die trotz der vor jeder Messung durchgeführten gründlichen Zellvereinzelung noch aneinander haften, von der Zählung ausschließen. Dieser Nachteil wird aber ausgeglichen, da die Festlegung der Filter für das gesamte Experiment und damit für alle Ansätze, die miteinander verglichen werden dürfen, gilt. Eine durch ein suboptimal gesetztes Gate bedingte Abweichung der Zählung von der tatsächlichen Populationsgröße träte dadurch in allen Ansätzen in genau der gleichen Weise auf. Die relativen Unterschiede zwischen den Ansätzen blieben dementsprechend unverändert und nur die absoluten Unterschiede, die für die Luciferaseexperimente unerheblich waren, konnten beeinflusst werden.

Der Vorteil der Gate-Setzung bleibt hingegen bestehen; Ereignisse, die ganz sicher keine Zellen, geschweige denn lebende transfizierte Zellen repräsentieren, werden ausgeschlossen.

Von jedem Ansatz wurden 10 000 Ereignisse registriert und in der beschriebenen Weise der prozentuale Anteil transfizierter Zellen in der lebenden Population ermittelt.

6. Ergebnisse

6.1 Einfluss von miR-BART2 auf die EB2-3'-UTR

6.1.1 Klonierung der EB2-3'-UTR

Die 3'-UTR des EBV-Proteins BMLF1, das auch als EB2 bezeichnet wird, ist eine potenzielle Ziel-mRNA für die miR-BART2 (Pfeffer *et al.*, 2004). Um die mögliche Interaktion zu untersuchen, wurde ein geeignetes Reporterplasmid hergestellt und als pGL3-EB2-3'UTR (s. Kap. 4.10.3.1) bezeichnet. Dazu wurde ein Teil der UTR, der die drei möglichen Bindungsstellen mit etwas Sicherheitsabstand zu den Enden hin enthält, amplifiziert. Das im Agarosegel aufgetrennte Amplifikat ist in Abb. 14 zu sehen.

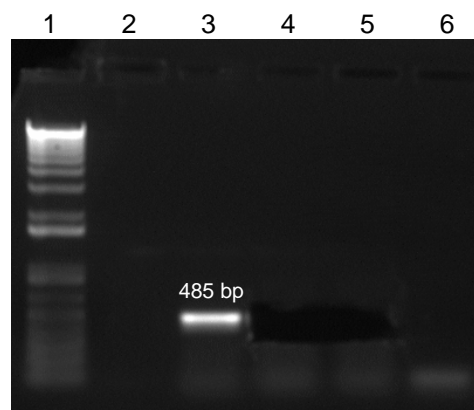


Abb. 14: Im Agarosegel aufgetrenntes Amplifikat eines Teils der EB2-3'-UTR

In den Spuren 3-5 liefen Aliquote desselben Ansatzes der Amplifikation aus M-ABA-Cosmiden. Die in Spur 3 erkennbare Bande entspricht dem einschließlich der ungeschnittenen Restriktionsenzymkennungssequenzen 485 bp großem Insert. Sie wurde in den Spuren 4 und 5 zur Weiterverarbeitung ausgeschnitten bevor die Dokumentation mittels kurzweiligem UV-Licht erfolgte. In Spur 6 aufgetragen ist eines von drei Aliquoten aus einem Ansatz, in dem die Amplifikation aus zellulärer Jijoye-DNA versucht wurde, aber keine Bande detektierbar war. Die Spur 2 zeigt eine Negativkontrolle der PCR, die aufgrund einer undichten Geltasche nicht korrekt durchlief, was sich in der fehlenden Primerfront ausdrückt. Die Kontrolle erwies sich als entbehrlich, da das Insert in der späteren klonierten Form zum Ausschluss von Mutationen vollständig sequenziert wurde. Der Vergleich der Bande in Spur

3 mit der Größenmarkerspur 1 zeigt, dass die Länge des Amplifikats in der Größenordnung des gewünschten Inserts liegt.

Das Amplifikat wurde reisoliert und mit *Nhe* I verdaut, wodurch seine Enden aufgrund gleicher Basenüberhänge kompatibel zu dem mit *Xba* I linearisierten pGL3-Vektor wurden. Es erfolgten Ligation, Transformation in pMOS-Bakterien und Anzucht mehrerer Klone. Zu deren Charakterisierung diente der in der Abb. 15 gezeigte Orientierungsverdau mit *Bgl* II. Bei richtiger Orientierung entstehen Fragmente von 3588 und 1890 bp, bei falscher Orientierung von 3112 und 2374 bp.

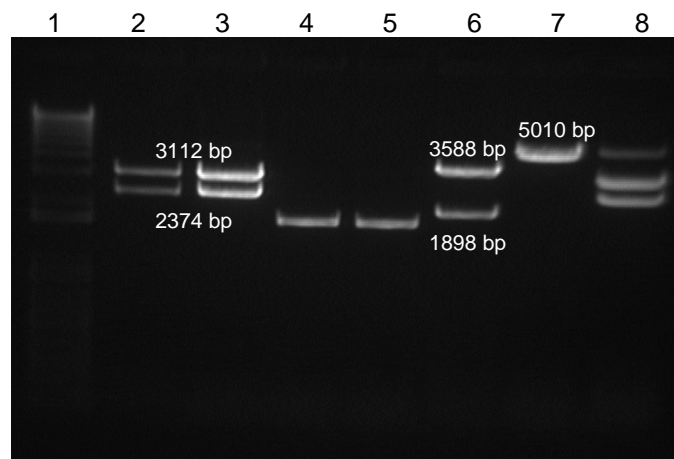


Abb. 15: Orientierungsverdau hergestellter Plasmide bei Klonierung der EB2-3'-UTR

Je nach Orientierung des klonierten Inserts resultierten unterschiedliche Restriktionsfragmente. In Spur 6 sieht man den benötigten pGL3-EB2-3'UTR, der das Insert in der gewünschten Orientierung enthält und für die folgenden Luciferase-Experimente verwendet wurde. Die Spuren 2 und 3 zeigen Klone, die das Insert in umgekehrter Orientierung enthalten. Davon vermehrt und als Negativkontrolle verwendet wurde der als pGL3-anti-EB2-3'UTR bezeichnetete Klon der dritten Spur. Im Verdau 7 lief der pGL3-Vektor, der offensichtlich kein Insert enthielt und mangels einer eingeführten zweiten *Bgl*-II-Schnittstelle nur linearisiert wurde. In Spur 8 ist unverdauter Vektor zu sehen. Die abgrenzbaren Banden resultieren daraus, dass die zirkularisierten Vektormoleküle unterschiedliche, aber definierte Raumstrukturen annehmen, die verschieden schnell durch das Gel laufen.

Die weiterverwendeten Plasmide pGL3-EB2-3'UTR und pGL3-anti-EB2-3'UTR wurden vermehrt und probeverdaut. Das Ergebnis ist in Abb. 16 zu sehen.

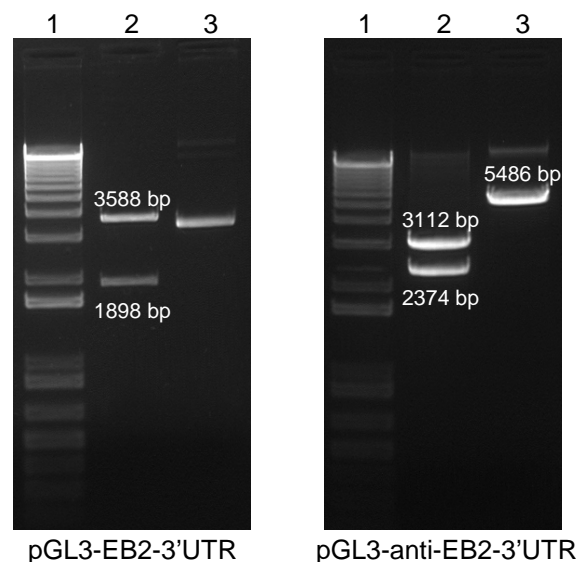


Abb. 16: Probeverdau verwendeter EB2-3'-UTR-enthaltender Klone

Links: Spur 2 zeigt den Verdau mit *Bgl* II, Spur 3 eine Negativkontrolle ohne Restriktionsenzym. Das 3588-bp-Fragment stellt den pGL3-Vektor mit dem Insert und ohne den rausgeschnittenen Luciferase-ORF, der als 1898-bp-Fragment weiter läuft, dar.

Rechts: In Spur 2 wurde mit *Bgl* II, in Spur 3 mit *Nhe* I verdaut. Das 3112-bp-Fragment besteht aus dem pGL3-Vektor ohne Insert und Luciferase-ORF, das 2374-bp-Fragment aus diesen beiden letztgenannten. Das 5486 bp große Fragment ist das zusammenhängende, aber linearisierte Gesamtkonstrukt, das nur eine Schnittstelle für *Nhe* I enthält.

6.1.2 Sequenzen der hergestellten Reporterkonstrukte

Die Reportergenkonstrukte pGL3-EB2-3'UTR und pGL3-anti-EB2-3'UTR wurden im Bereich der Inserts sequenziert, um auszuschließen, dass es während der Herstellung zu unerwünschten Mutationen insbesondere in den potenziellen Zielsequenzen der 3'-UTR gekommen wäre. Dazu wurden die Primer „5' pGL3 Seq“ und „3' pGL3 Seq BglIII“ verwendet, die von beiden Seiten kommend im pGL3-

Vektor binden. Dies gewährleistete eine vollständige Sequenzierung auch der Enden des Inserts. Es zeigte sich, dass beide Klone exakt die Sequenzen besaßen, die anhand des im EBV-Genom des B95-8-Stamms gemäß der Gene Bank Accession Number V01555.2 erwartet worden waren.

In den nachfolgend dargestellten Sequenzen entsprechen die Farbmarkierungen denen, die auch bei der Beschreibung der Primer in Kapitel 4.9 verwendet werden. Zusätzlich wurden die vorhergesagten potenziellen Bindungsstellen für die miR-BART2 gelbgrün hervorgehoben, was allerdings in dem Antisense-Konstrukt ausschließlich der Orientierung dient.

6.1.2.1 Sequenz von pGL3-anti-EB2-3'UTR

... (bekannter und nicht sequenzierter pGL3-Promoter-Vektor bis Position 1919)

GATCGCCGTG	TAATCTAGC	TGGCTTTGGG	CTCTGGAAGC	CTGGCCGGTG
CTCGGCGTAA	CCAGATTTAC	ACCTCGGGTC	TCGAGCGGAG	ACGCAGCATT
TTCTGCGCCC	GGGGAGATCA	TTCGGTGGCA	TCCCTGAAGG	AGACCCTCCA
TAAATGCCCCG	TGGGATCTGC	TGGCCATCTC	TGCCTTGACC	GTTCTTGTCTG
TCTGTGTGAT	GATTGTGTTG	CATGTGCACG	CAGAGGTGTT	CTTTGGACTC
TCTAGATACC	TGCCCCTCTT	TCTCTGTGGG	GCGATGGCCT	CCGGGGGGCT
GTACCTGGGC	CATTCCAGCA	TCATTGCATG	TGTCATGGCC	ACCCTCTGCA
CCCTGACATC	TGTTGTGGTA	TATTTCTCTCC	ATGAAACCCT	TGGACCCCTG
GGCAAGACCG	TGCTGTTTAT	CTCAATCTTT	GTCTATTACT	TTAGCGGGGT
AGCGGCCCTG	AGCGCAGCTA	TGCGCTACAA	GCTAGATCTG	CTAGAGTCGG
GGCGGCCGGC	CGCTTCGAGC	AGACATGATA	AGATACATTG	ATGAGTTTGG
ACAAACCACA	ACTAGAATGC	AGTGAAAAAA	ATGCTTTATT	TGTGAAATTT
GTGATGCTAT	TGCTTTATTT	GTAACCATTA	TAAGCTGCAA	TAAACAAGTT
AACAACAACA	ATTGCATTCA	TTTTATGTTT	CAGGTTTCAGG	GGGAGGTGTG
GGAGGTTTTT	TAAAGCAAGT	AAAACCTCTA	CAAATGTGGT	AAAATCGATA
AGGATCCGTC	GACCGATG	... (bekannter und nicht sequenzierter pGL3-Promoter-Vektor ab Position 2213)		

6.1.2.2 Sequenz von pGL3-EB2-3'UTR

... (bekannter und nicht sequenzierter pGL3-Promoter-Vektor bis Position 1894)

```
TCATAAAGGC CAAGAAGGGC GGAAAGATCG CCGTGTAAT TTAGCAGATC
TAGCTTGTAG CGCATAGCTG CGCTCAGGGC CGCTACCCCG CTAAAGTAAT
AGACAAAGAT TGAGATAAAC AGCACGGTCT TGCCCAGGGG TCCAAGGGTT
TCATGGAGGA AATATACCAC AACAGATGTC AGGGTGCAGA GGGTGGCCAT
GACACATGCA ATGATGCTGG AATGGCCAG GTACAGCCCC CCGGAGGCCA
TCGCCCCACA GAGAAAGAGG GGCAGGTATC TAGAGAGTCC AAAGAACACC
TCTGCGTGCA CATGCAACAC AATCATCACA CAGACGACAA GAACGGTCAA
GGCAGAGATG GCCAGCAGAT CCCACGGGCA TTTATGGAGG GTCTCCTTCA
GGGATGCCAC CGAATGATCT CCCCGGGCGC AGAAAATGCT GCGTCTCCGC
TCGAGACCCG AGGTGTAAAT CTGGTTACGC CGAGCACCGG CCAGGCTTCC
AGAGCCCAA GCCAGCTAGA GTCGGGGCGG CCGGCCGCTT CGAGCAGACA
TGATAAGATA CATTGATGAG TTTGGACAAA CCACAAC TAG AATGCAGTGA
AAAAAATGCT TTATTTGTGA AATTTGTGAT GCTATTGCTT TATTTGTAAC
CATTATAAGC TGCAATAAAC AAGTTAACAA CAACAATTGC ATTCATTTTA
TGTTTCAGGT TCAGGGGGAG GTGTGGGAGG TTTTTTAAAG CAAGTAAAC
CTCTACAAAT GTGGTAAAAT CGATAAGGAT CCGTCGACCG ATGCCCTTG ...
```

(bekannter und nicht sequenzierter pGL3-Promoter-Vektor ab Position 2219)

6.1.3 Ergebnisse der Luciferase-Reportergen-Experimente

In den gezeigten Ergebnissen werden immer auch die mitgeführten Kontrollen, die jeweils nur einzelne Effektorplasmide enthalten, genannt. Die bei diesen Ansätzen gemessenen Lichtemissionen bewegten sich mangels Luciferase in der Größenordnung des Grundrauschens des Luminometers. Die geringen Unterschiede zwischen den Kontrollen auf diesem Niveau sind dementsprechend uninteressant und in den Abbildungen maßstabsbedingt nicht erkennbar. Deren Skalierung orientiert sich an den Lichtmengen von Luciferase-enthaltenden Ansätzen und ermöglicht den Vergleich dieser Transfektionen. Der Sinn der Kontrollen bestand darin, dass mit

ihnen bestimmte Fehler ausgeschlossen werden konnten. So garantierte beispielsweise die Feststellung der nicht vorhandenen Luciferaseaktivität, dass in der Effektorplasmid-DNA keine Kontamination mit pGL3-abgeleiteter DNA vorliegen konnte und in den Zellen auch sonst keine wie auch immer geartete "endogene" Luciferaseexpression stattfand.

Der durchgehend in allen Experimenten kotransfizierte pEGFP-C1-Vektor (vgl. Kap. 5.5) ist Voraussetzung dafür, dass die transfektionsratenbereinigten Werte in den Histogrammen überhaupt angegeben werden können und wird nicht mehr gesondert erwähnt.

6.1.3.1 Einfluss der miR-155 auf den pGL3-Promoter-Vektor

Die zelluläre miR-155 sollte als unspezifische Kontroll-miRNA in den Luciferase-Experimenten dienen. Um einen möglichen Einfluss auf die Luciferaseexpression durch den Ausgangsvektor pGL3 der Reportergenkonstrukte zu überprüfen, wurden entsprechende Ansätze untersucht. Die Ansätze enthielten den Leervektor pSG5 des Effektorkonstrukts, pSG5-miR-155, pGL3 und pSG5 gemeinsam sowie pGL3 zusammen mit pSG5-miR-155. Es zeigte sich der in Abb. 17 sichtbare Unterschied zwischen den Ansätzen, die beide Leervektoren enthielten, und denen, die mit pGL3 und pSG5-miR-155 kontransfiziert waren.

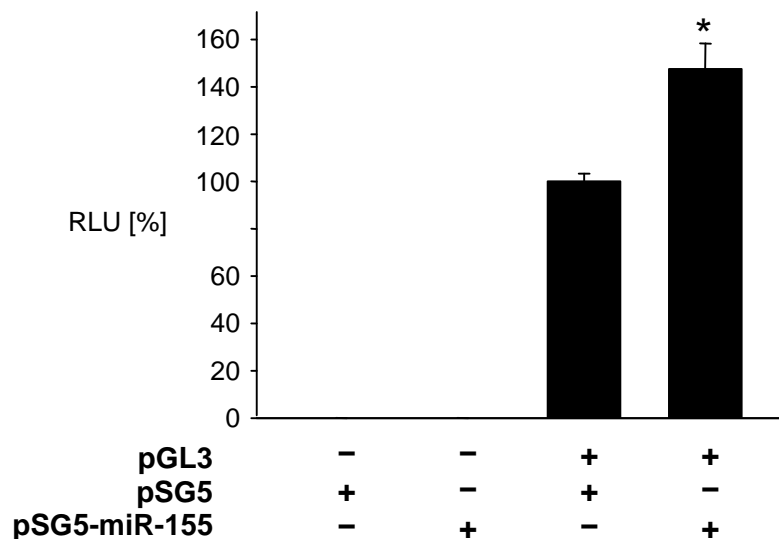


Abb. 17: Einfluss von pSG5-miR-155 auf den Leervektor pGL3

Die Abbildung zeigt die Mittelwerte der Ergebnisse aus 7 unabhängigen Experimenten mit Doppelansätzen. Der Wert für die Transfektion mit pGL3 und pSG5 wurde auf 100% gesetzt. Aus den in Kap. 5.4.1 erläuterten Gründen wird auch dort ein Fehlerbalken angegeben. Angegeben ist jeweils der mittlere Fehler des Mittelwertes. Die um 4-5 Größenordnungen niedrigeren Messungen der Kontrollen sind nicht mehr erkennbar.

Der signifikante Unterschied ($p = 0,00044$) zwischen den beiden letzten Ansätzen war für die Verwendung der miR-155 als eine Kontroll-miRNA, die keinen Einfluss haben soll, weder erwartet noch erwünscht. Trotzdem wurde sie für weitere

Versuchsreihen mit anderen Fragestellungen erneut verwendet. Die Gründe werden in Kap. 7.1.3 diskutiert.

6.1.3.2 Einfluss der miR-BART2 auf den pGL3-Promoter-Vektor

Um die potenzielle Bindung der miR-BART2 an die EB2-3'-UTR zu überprüfen, war es wichtig, dass nicht bereits der für die Klonierung verwendete Leervektor pGL3 einer Regulation durch miR-BART2 unterliegt. Um dieses auszuschließen, wurden die entsprechenden Ansätze untersucht, deren Ergebnisse Abb. 18 gezeigt sind.

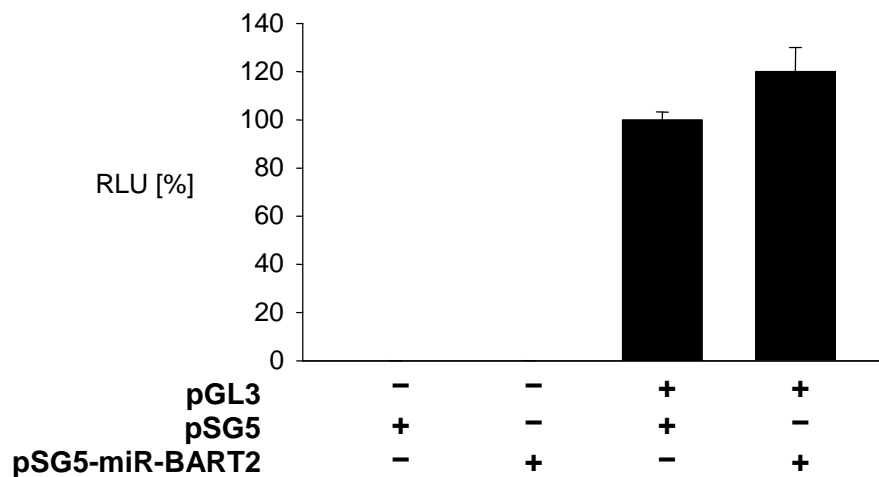


Abb. 18: Einfluss von pSG5-miR-BART2 auf den Leervektor pGL3

Dargestellt sind die Mittelwerte und ihre mittleren Fehler aus 7 unabhängigen Experimenten mit Doppelansätzen. Die Emission bei Transfektion mit den beiden Leervektoren wurde auf 100% gesetzt. Die nur Effektorplasmid-enthaltenden Kontrollen bleiben unterhalb der Darstellungsgrenze. Die Lichtmenge bei Transfektion mit pGL3 und miR-BART2 zeigt gegenüber der Konstellation ohne miR-BART2 eine nicht signifikante ($p = 0,11$) Steigerung um etwa 20%.

Die Expression der miR-BART2 hatte keinen signifikanten Effekt auf die gemessene Lichtemission. Die Experimente gaben keinerlei Anhalt dafür, dass die Luciferaseexpression durch die BART2 supprimiert wird, es zeigte sich sogar die gegenteilige, aber nicht signifikante, 20%ige Steigerung. Damit erschien ein auf

dem pGL3-Vektor basierendes Konstrukt zum Nachweis einer eventuellen Repression durch die miR-BART2 geeignet.

6.1.3.3 Einfluss von miR-BART2 und miR-155 auf pGL3-EB2-3'UTR

Die Abb. 19 zeigt das Ergebnis der Prüfung eines miR-BART2-Effekts auf das die potenziellen Bindungsstellen enthaltende Konstrukt pGL3-EB2-3'UTR. Die als Referenz dienenden und parallel untersuchten Kombinationen des Reporterkonstrukts zum einen mit pSG5 und zum anderen mit der unspezifischen miR-155 sind ebenfalls gezeigt.

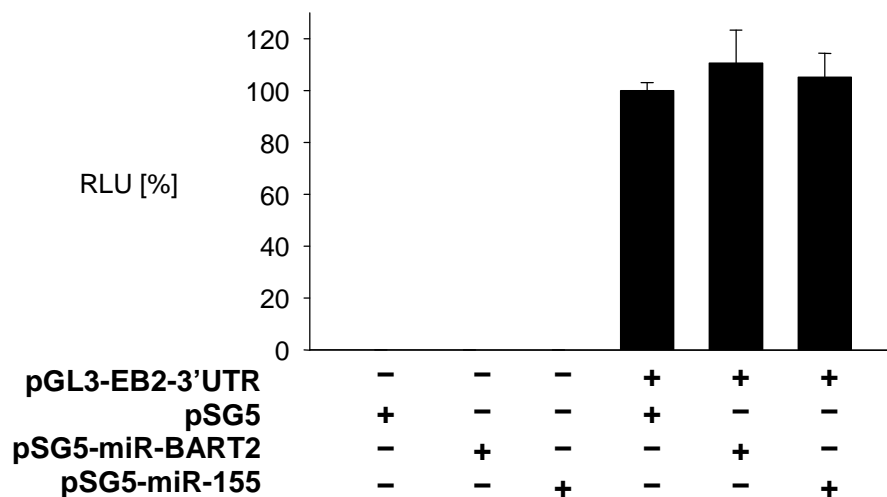


Abb. 19: Einfluss von miR-BART2 und miR-155 auf pGL3-EB2-3'UTR

Dargestellt sind die Mittelwerte und ihre mittleren Fehler aus 7 unabhängigen Experimenten mit Doppelansätzen. Das Ergebnis der Transfektion von pGL3-EB2-3'UTR und pSG5 wurde auf 100% gesetzt. Ihmgegenüber zeigt die Transfektion mit pSG5-BART2 anstelle des Leervektors eine geringe Zunahme. Diese liegt vom Betrag her noch unter dem angegebenen Standardfehler. Die gleiche Konstellation findet sich bei dem Ergebnis mit der zellulären miR-155.

Da die gezeigten Daten denselben Experimenten entstammen wie die Ergebnisse in Abb. 17 und Abb. 18, sind die Ergebnisse der als Kontrollen einzeln transfizierten Effektorplasmide identisch. Sie sind allerdings auf den hier verwendeten Bezugspunkt normiert und sähen daher bei passendem Maßstab betragsmäßig etwas anders aus. Wie bei den anderen Ergebnissen auch, wird auf die zusätzliche Darstellung verzichtet.

Der Unterschied zwischen der Konstellation mit miR-BART2 und ohne miRNA war nicht signifikant ($p = 0,42$). Selbiges gilt für den Vergleich zwischen der Kontransfektion mit und ohne miR-155 ($p = 0,61$).

6.1.3.4 Einfluss von miR-BART2 und miR-155 auf pGL3-anti-EB2-3'UTR

Die Untersuchung des antisense klonierten pGL3-anti-EB2-3'UTR sollte in erster Linie der Kontrolle möglicher beobachteter Effekte beim pGL3-EB2-3'UTR dienen. Angesichts des dort fehlenden signifikanten Effekts wäre eigentlich auch die Untersuchung des Antisense-Plasmids nicht mehr interessant gewesen. Es gab jedoch einen weiteren Grund, der die Testung auch dieses Konstrukts nahe legte:

Während der miRNA-Biosynthese (vgl. Kap. 3.3.1) wird zusätzlich ein der jeweiligen miRNA vollständig komplementäres Oligonukleotid gebildet. Diese als miRNA* bezeichnete Nukleinsäure entsteht bei der Helikase-katalysierten Aufspaltung des mit der eigentlichen miRNA gebildeten Doppelstrangs (Bartel, 2004). Es wird in der Folge abgebaut, wobei aber unklar ist, wie lange es in der Zelle nachweisbar bleibt und ob es noch eine biologische Funktion ausüben kann. Eine solche Funktion wäre beispielsweise, analog dem Wirkmechanismus „normaler“ miRNAs, die Bindung an eine komplementäre mRNA mit den entsprechenden regulatorischen Konsequenzen. Zur Testung eines solchen Vorgangs bot sich der pGL3-anti-EB2-3'UTR an, da er genau die komplementären Sequenzen der vorhergesagten miR-BART2-Bindungsstellen besitzt und damit ein potenziell geeignetes Ziel für die miR*-BART2 darstellt.

Das Ergebnis der Experimente zeigt die Abb. 20.

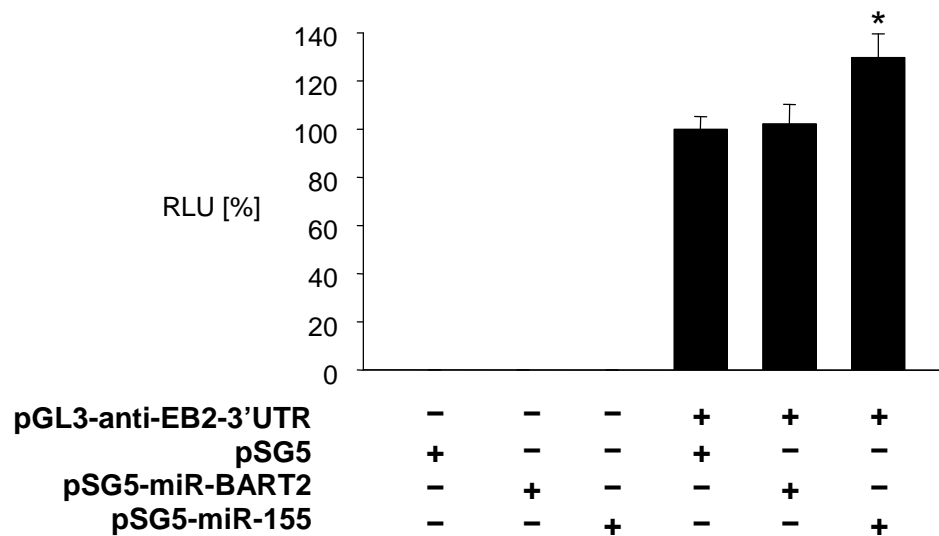


Abb. 20: Einfluss von miR-BART2 und miR-155 auf pGL3-anti-EB2-3'UTR

Gezeigt sind die nicht Luciferase-exprimierenden Kontrollen sowie die drei sich in ihrer miRNA-Expression unterscheidenden Konstellationen mit pGL3-anti-EB2-3'UTR. Es handelt sich um die Mittelwerte und ihre mittleren Fehler von 7 unabhängigen Experimenten mit Doppelansätzen. Der Wert für mit pGL3-anti-EB2-3'UTR ohne miRNA-exprimierendes Plasmid wurde auf 100% gesetzt. Zwischen ihm und der entsprechenden Situation mit miR-BART2 ist ein Unterschied kaum erkennbar und erst recht nicht signifikant ($p = 0,79$). In der Transfektion mit pSG5-miR-155 zeigt sich dagegen ein signifikanter Anstieg um rund 30% ($p = 0,018$).

Es fand sich kein Unterschied zwischen den Ansätzen mit und ohne pSG5-miR-BART2. Der Anstieg zwischen der pSG5-Kotransfektion und der miR155-Kontrolle ist zwar umso deutlicher und auch signifikant, aber mangels BART2-Effekts für die zugrunde liegende Fragestellung unerheblich.

6.2 Einfluss von B95-8-Stamm-miRNAs auf die BALF5-3'-UTR

Die Regulation der BALF5-Polymerase über Bindung der miR-BART2 an die von Pfeffer (2004) prognostizierte Bindungsstelle der BALF5-3'-UTR ist mittlerweile experimentell nachgewiesen (Barth *et al.*, 2008). Der gezeigte Effekt ist allerdings

nicht ausreichend, um als alleiniger Faktor die Expression der BALF5 zu unterbinden und damit die Latenz des Virus aufrecht zu erhalten.

Bei der Suche nach den unbekannten zusätzlichen Suppressoren bieten sich die anderen EBV-miRNAs an. Aussichtsreiche Kandidaten waren insbesondere die verbliebenen miRNAs des B95-8-Stammes, da bei diesem ein latenter Zustand beschrieben wird (Grundhoff *et al.*, 2006), obwohl ihm ein Großteil der bekannten EBV-miRNAs fehlt.

Es sollte daher mittels des Reportergenkonstruktes pGL3-BALF5-3'UTR eine mögliche Regulation durch die miR-BART1, miR-BHRF1-1, miR-BHRF1-2 und miR-BHRF1-3 untersucht werden. Da der bekannte miR-BART2-Effekt an einem Konstrukt untersucht worden ist, das zwar die vorhergesagte Zielsequenz, nicht aber die gesamte BALF5-3'-UTR enthielt, sollte an letzterer auch die miR-BART2 erneut getestet werden.

Analog zu den Untersuchungen mit dem pGL3-EB2-3'UTR-Konstrukt (s. Kap. 6.1.3) wurden auch hier zur Kontrolle mögliche Effekte auf den Leervektor pGL3 untersucht. Diese Untersuchungen fanden jeweils innerhalb desselben Experiments und damit unter identischen Bedingungen statt, selbst wenn diese nicht beeinflusst werden konnten (z.B. unterschiedlich starkes Zellwachstum zwischen einzelnen Experimenten). Da sie aber einer andere Fragestellung, nämlich der Erkennung unspezifischer (BALF5-3'-UTR-unabhängiger) Effekte auf die Luciferaseexpression dienten, werden sie im Folgenden in jeweils gesonderter Abbildung gezeigt. Dies ermöglicht auch die jeweils sinnvolle unterschiedliche Normierung der Werte, nämlich bei den Leervektor-Experimenten auf die Konstellation mit pGL3 und pSG5 und bei den pGL3-EB2-3'UTR-Experimenten auf ebendieses Konstrukt (mit pSG5). Die statistische Aussagekraft der Ergebnisse aus beiden Datenmengen ist jeweils gleich, da durch die gemeinsame Untersuchung die gleiche Anzahl von Experimenten zugrunde liegen.

Die kein Reporterplasmid enthaltenden Kontrollen werden gezeigt, aber, da sie erwartungsgemäß unterhalb der Darstellungsgrenze blieben, nicht mehr kommentiert.

6.2.1 Einfluss von miR-BART1 auf den pGL3-Promoter-Vektor

Die Abb. 21 zeigt die Ergebnisse zur miR-BART1 mit dem Leervektor pGL3. Als mögliche Kontroll-miRNA fungierte die miR-122. Da diese bislang nicht getestet und ihre Eignung dementsprechend nicht sicher war, wurden zusätzlich entsprechende Kontrollen mit miR-155 mitgeführt.

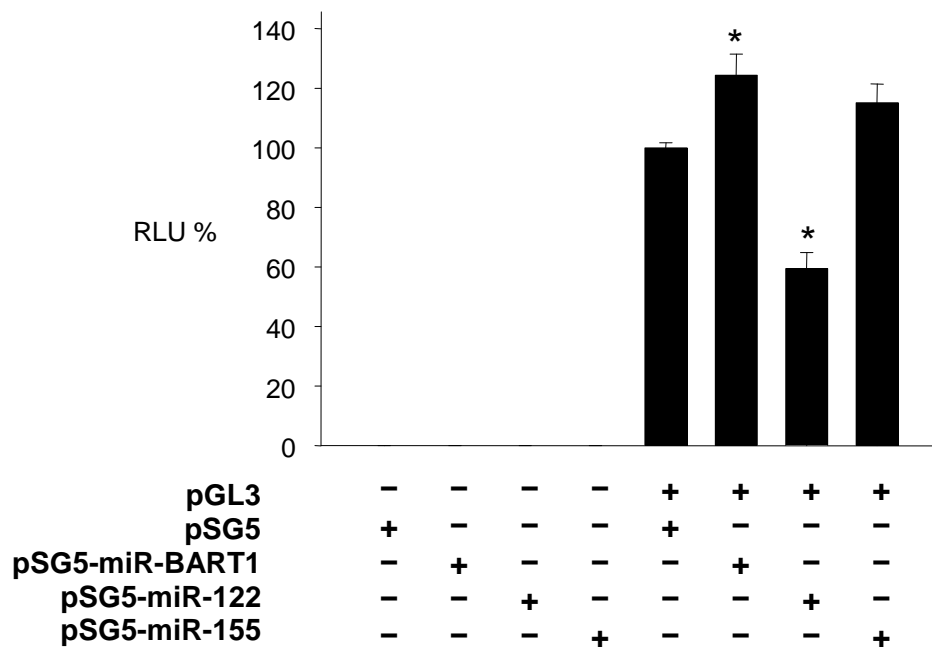


Abb. 21: Einfluss von pSG5-miR-BART1, -122 und -155 auf pGL3

Gezeigt sind die Mittelwerte und ihre mittleren Fehler aus 3 unabhängigen Experimenten mit Doppelansätzen. Gegenüber der Leervektorenkonstellation zeigt sich beim miR-BART1 exprimierenden Ansatz eine Zunahme der Luciferaseaktivität von rund 20%. Dagegen findet sich eine Abnahme um etwa 40% in dem Ansatz mit pSG5-miR-122. Beide Unterschiede sind signifikant ($p = 0,018$ und $p = 0,00097$). Die Konstellation mit miR-155 zeigt einen nicht signifikanten Anstieg von rund 15% ($p = 0,058$).

Es fanden sich signifikante Veränderungen in Form eines Anstiegs bei miR-BART1 und in Form eines Abfalls der Lichtemission bei miR-122. Der bei miR-155 beobachtete Anstieg war nicht signifikant.

6.2.2 Einfluss von miR-BART1 auf pGL3-BALF5-3'UTR

Die Ergebnisse der Testung der miR-BART1 mit dem BALF5-3'-UTR-Reporterkonstrukt sind in Abb. 22 zu sehen.

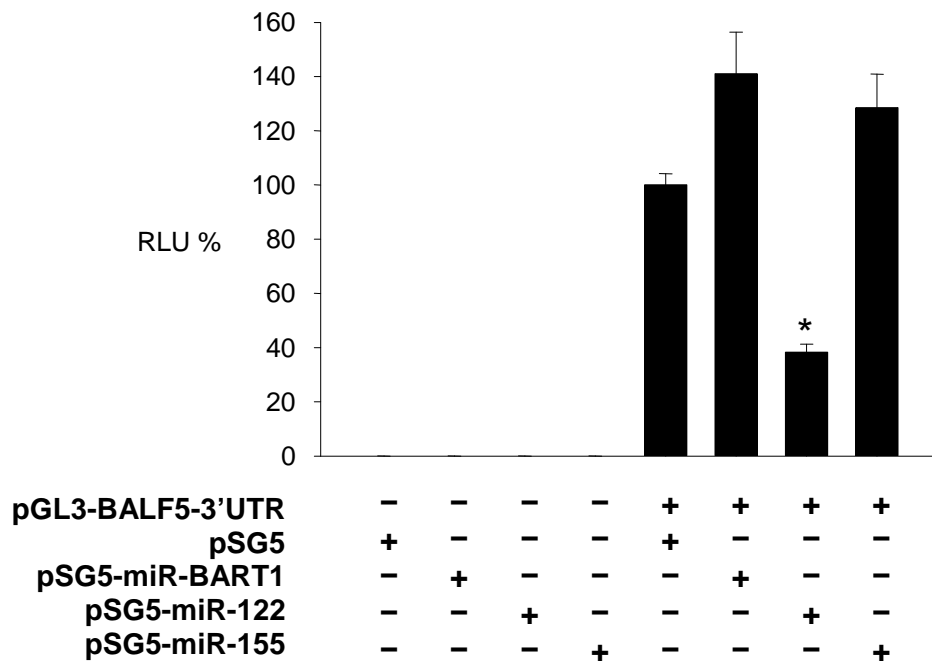


Abb. 22: Einfluss von pSG5-miR-BART1, -122 und -155 auf pGL3-BALF5-3'UTR

Gezeigt sind die Mittelwerte und ihre mittleren Fehler aus 3 unabhängigen Experimenten mit Doppelansätzen. Beobachtet wurde ein Anstieg von rund 40% für die BART1-enthaltenden Ansätze, der allerdings nicht signifikant ist ($p = 0,068$). Der Abfall auf etwa 40% für pSG5-miR-122 ist mit $p = 0,000070$ signifikant, der Anstieg bei miR-155 nicht ($p = 0,10$).

Qualitativ ähneln die Resultate den gewonnenen Daten der zuvor gezeigten Testung mit dem Leervektor pGL3: Ein Anstieg bei BART1, der hier allerdings nicht signifikant ist, eine signifikante Abnahme bei miR-122 und der insignifikante Anstieg bei miR-155. Die Veränderungen sind jedoch stärker ausgeprägt.

6.2.3 Einfluss von miR-BART2 auf den pGL3-Promoter-Vektor

Abb. 23 zeigt die die Ergebnisse mit pGL3 und miR-BART2.

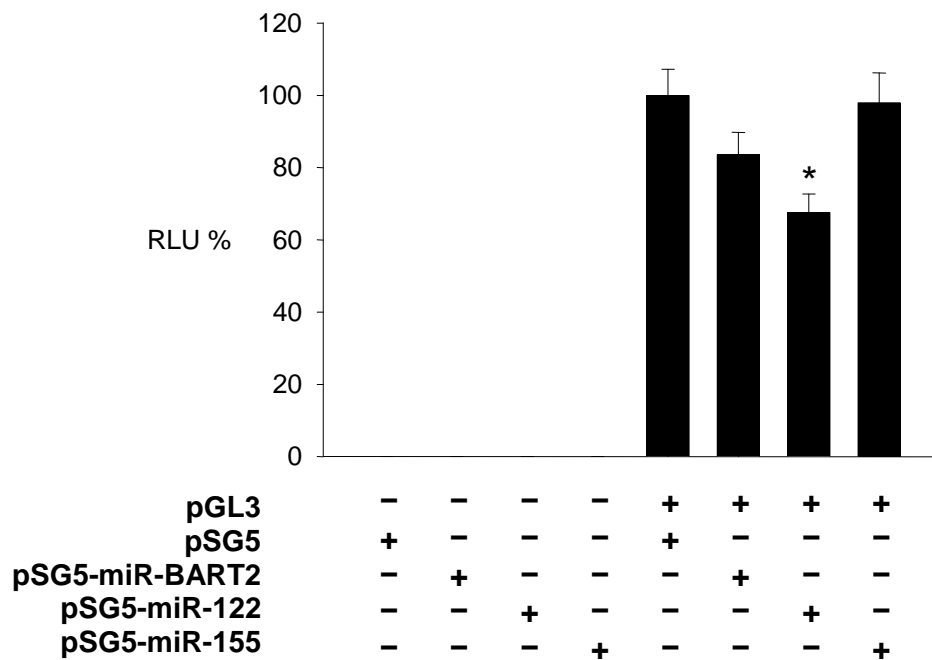


Abb. 23: Einfluss von pSG5-miR-BART2, -122 und -155 auf pGL3

Gezeigt sind die Mittelwerte und ihre mittleren Fehler aus zwei unabhängigen Experimenten mit Doppelansätzen. Gegenüber der Leervektorkonstellation erkennt man eine zirka 15%ige Abnahme bei miR-BART2 ($p = 0,17$) sowie einen signifikanten Abfall für pSG5-miR-122 auf knapp 70% ($p = 0,047$). Die Ansätze mit miR-155 zeigen praktisch keine Änderung der Lichtemission.

Es wurde eine insignifikante Aktivitätsminderung bei der miR-BART2 beobachtet. Die Emission der miR-155-exprimierenden Ansätzen war praktisch unverändert gegenüber derjenigen bei der Referenzkonstellation. Bei pSG5-miR-122 zeigte sich erneut eine signifikante Abnahme.

6.2.4 Einfluss von miR-BART2 auf pGL3-BALF5-3'UTR

In Abb. 24 sieht man den Einfluss der miR-BART2 auf das Reportergenkonstrukt.

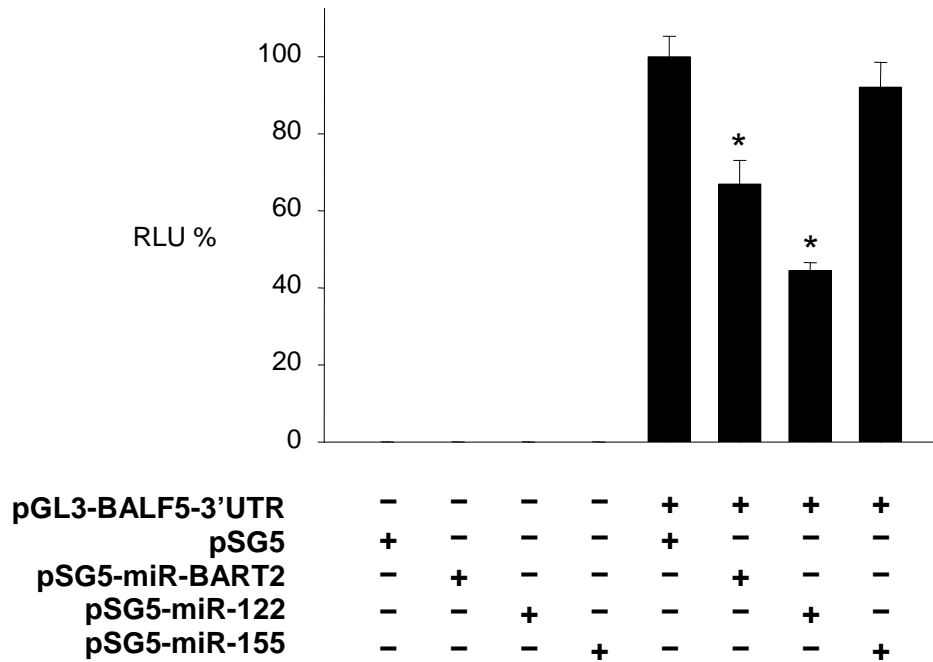


Abb. 24: Einfluss von pSG5-miR-BART2, -122 und -155 auf pGL3-BALF5-3'UTR

Gezeigt sind die Mittelwerte und ihre mittleren Fehler aus zwei unabhängigen Experimenten mit Doppelansätzen. Erkennbar sind die über 30%ige Lichtemissionsabnahme in den miR-BART2 enthaltenden Ansätzen und eine Abnahme bei pSG5-miR-122 auf unter 50%. Beide Effekte sind signifikant ($p = 0,012$ und $p = 0,00053$). Bei der miR-155-Kontrolle ist es zu keinem signifikanten Abfall gekommen.

Das Ergebnis zeigt die bekannte Suppression der BALF5-3'-UTR durch miR-BART2. Der in den zuvor gezeigten Daten zu miR-BART1 (Kap. 6.2.2) sichtbare Abfall in den pSG5-miR-122-enthaltenden Ansätzen ist auch hier vorhanden. Die Kontrollen mit miR-155 weisen nur eine insignifikant verringerte Lichtemission auf ($p = 0,48$).

6.2.5 Einfluss von miR-BHRF1-1 auf den pGL3-Promoter-Vektor

Das Ergebnis der Testung zeigt die Abb. 25.

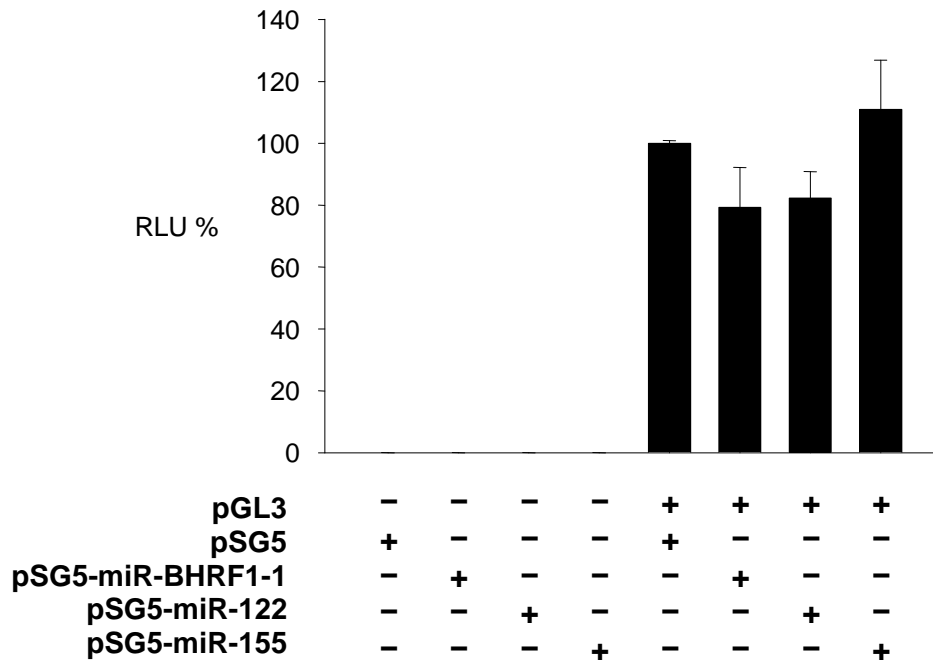


Abb. 25: Einfluss von pSG5-miR-BHRF1-1, -122 und -155 auf pGL3

Gezeigt sind die Mittelwerte und ihre mittleren Fehler aus zwei unabhängigen Experimenten mit Doppelansätzen. Man erkennt vergleichbar starke Abnahmen um die 20% in den Ansätzen mit pSG5-miR-BHRF1-1 und -miR-122. Beide sind nicht signifikant ($p = 0,22$ und $p = 0,13$). In der miR-155-Kontrolle zeigt sich ein insignifikanter Anstieg von rund 10% ($p = 0,54$).

Es fanden sich keine signifikanten Veränderungen.

6.2.6 Einfluss von miR-BHRF1-1 auf pGL3-BALF5-3'UTR

Die Abb. 26 zeigt den Einfluss der miR-BHRF1-1 und der Kontroll-miRNAs auf das Reporterkonstrukt.

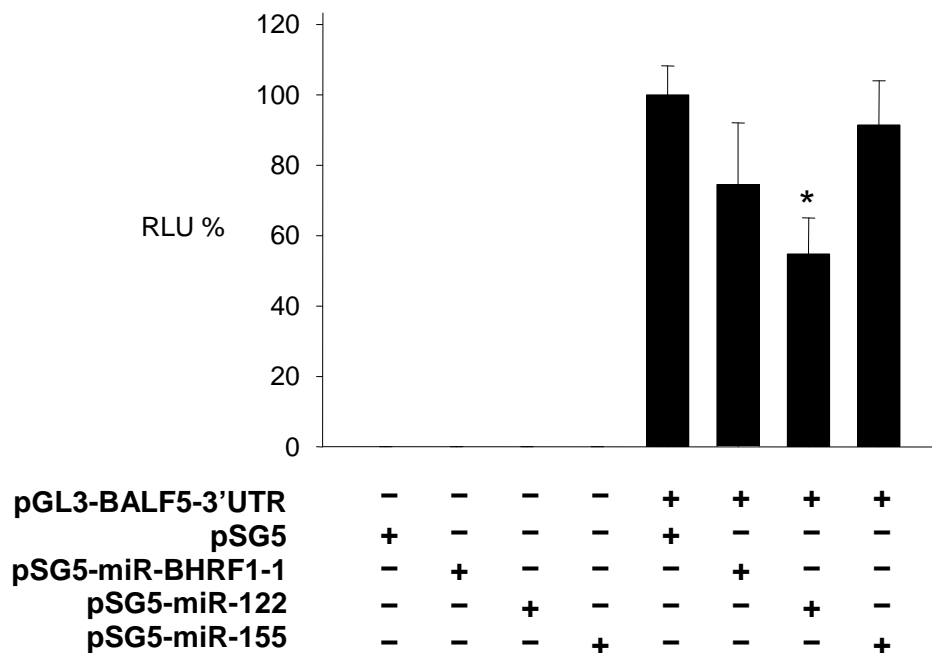


Abb. 26: Einfluss von pSG5-miR-BHRF1-1, -122 und -155 auf pGL3-BALF5-3'UTR

Gezeigt sind die Mittelwerte und ihre mittleren Fehler aus zwei unabhängigen Experimenten mit Doppelansätzen. Man erkennt Abnahmen bei miR-BHRF1-1 und miR-122 (25% und 45%). Diejenige bei miR-122 ist signifikant ($p = 0,0077$), diejenige bei BHRF1-1 nicht ($p = 0,17$). Die Veränderung in ihrem Ausmaß noch unter dem Betrag des Standardfehlers.

Weder die BHRF1-1- noch die miR-155-enthaltenden Ansätzen zeigten signifikante Veränderungen. Der auch in allen anderen diese Konstellation enthaltenden Experimenten beobachtete pSG5-miR-122-Abfall war auch hier vorhanden und signifikant.

6.2.7 Einfluss von miR-BHRF1-2 und -1-3 auf den pGL3-Promoter-Vektor

Abb. 27 zeigt die Testung der mittels desselben Plasmids gemeinsam exprimierten miR-BHRF1-2 und -1-3.

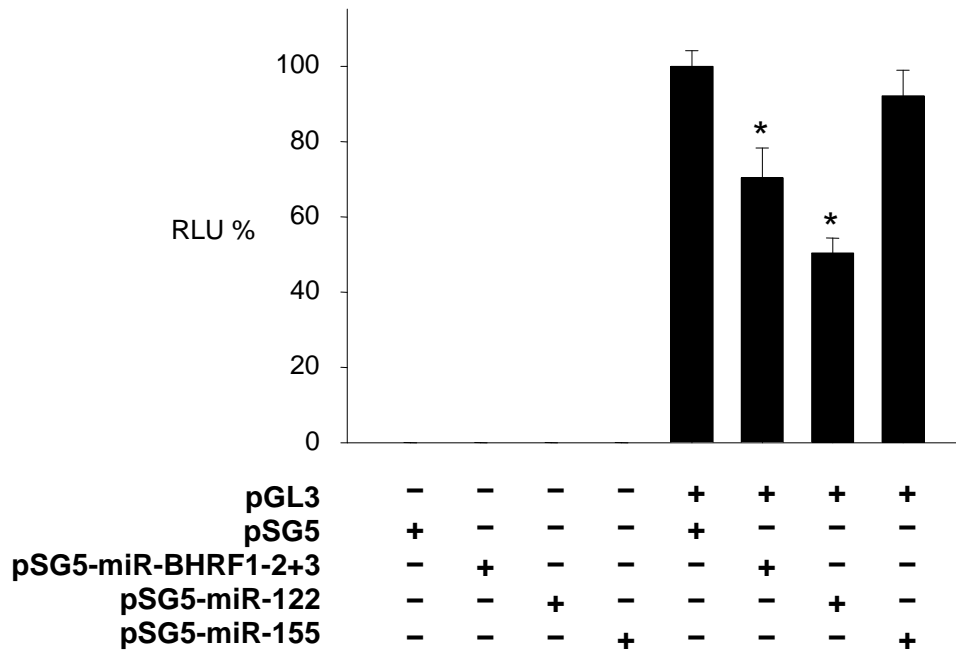


Abb. 27: Einfluss von pSG5-miR-BHRF1-2+3, -122 und -155 auf pGL3

Gezeigt sind die Mittelwerte und ihre mittleren Fehler aus 3 unabhängigen Experimenten mit Doppelansätzen. Während der geringe Abfall bei miR-155 insignifikant bleibt ($p = 0,34$), zeigen miR-BHRF1-2 und -3 sowie die miR-122 signifikante Abnahmen. Bei den ersten beiden miRNAs beträgt diese etwa 30% ($p = 0,027$), bei der miR-122 50% ($p = 0,00040$).

Die durch den pGL3-Leervektor vermittelte Luciferaseexpression reagierte in den pSG5-BHRF1-2+3-enthaltenden Ansätzen mit einer signifikanten Abnahme. In noch stärkerem Ausmaß war dies ebenfalls in den miR-122 enthaltenden Ansätzen der Fall.

6.2.8 Einfluss von miR-BHRF1-2 und -1-3 auf pGL3-BALF5-3'UTR

Die den vorigen Daten analogen Ergebnisse mit dem Reporterkonstrukt zeigt die folgende Abb. 28.

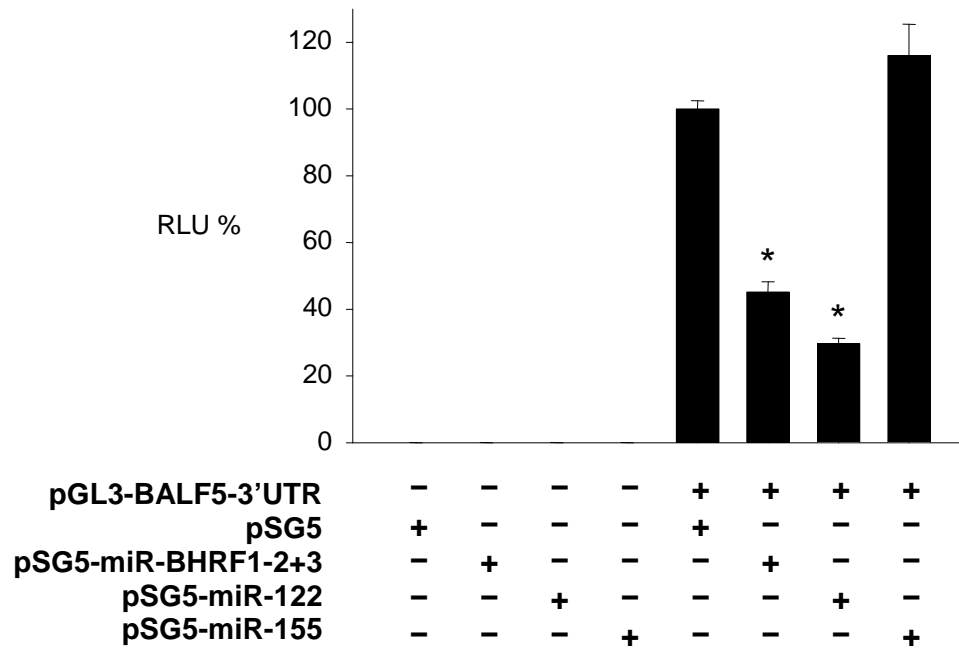


Abb. 28: Einfluss von pSG5-miR-BHRF1-2+3, -122 und -155 auf pGL3

Gezeigt sind die Mittelwerte und ihre mittleren Fehler aus 3 unabhängigen Experimenten mit Doppelansätzen. Man erkennt deutliche und signifikante Abnahmen sowohl bei den BHRF1-miRNAs als auch bei miR-122. Die erstgenannte beträgt über 50% ($p = 0,000062$), die zweite rund 70% ($p = 0,0000018$). Demgegenüber zeigt die Konstellation mit miR-155 eine nicht signifikante Zunahme der Lichtemission ($p = 0,17$).

Es fand sich eine signifikante Aktivitätsminderung für die beiden BHRF1-miRNAs, die allerdings – wenn auch in geringerem Ausmaß – auch schon bei den entsprechenden Leervektor-Experimenten sichtbar gewesen war. Die Abnahme bei miR-122 passt zu den zuvor erhobenen und gezeigten Daten. Die miR-155-Kontrollen wiesen keine signifikante Änderung der Lichtemission auf.

6.2.9 Untersuchung möglicher Synergieeffekte

In den bis hierhin erhobenen Daten waren trotz Testung aller verfügbaren B95-8-miRNAs außer dem bereits vorher bekannten miR-BART2-Effekt keine weiteren signifikanten Abnahmen bei viralen miRNAs beobachtet worden, oder, im Falle von pSG5-BHRF1-2+3, die Effekte waren auch in den Leervektor-Kontrollen aufgetreten (s. Abb. 27). In diesem letztgenannten Fall war die Aktivitätsminderung beim Reporterkonstrukt allerdings stärker ausgeprägt als beim pGL3-Leervektor, was man als Hinweis auf einen womöglich trotzdem bestehenden spezifischen Einfluss deuten könnte. Zusätzlich war denkbar, dass Einflüsse, die bei isoliert vorliegenden miRNAs gering ausfallen oder gar nicht beobachtet werden, bei gemeinsamer miRNA-Expression stärker ausfallen. Um solche synergistischen Effekte zu untersuchen, schien die Kombination mit dem bekannten Suppressor miR-BART2 am sinnvollsten.

6.2.9.1 Einfluss von miR-BART2, -BHRF1-2 und -1-3 auf pGL3

Um die Vergleichbarkeit der verschiedenen Ansätze zu gewährleisten, war die Gesamtmenge an pSG5-abgeleiteter DNA mit 0,8 µg in allen Konstellationen gleich. Sie setzt sich in den Ansätzen, die zwei verschiedene pSG5-Plasmide enthalten, aus jeweils 0,4 µg DNA je Plasmid zusammen, bei den Ansätzen, die nur mit dem Leervektor pSG5 transfiziert wurden, entfallen auf diesen die gesamten 0,8 µg. Das Ergebnis der Testung mit pGL3 ist in Abb. 29 zu sehen.

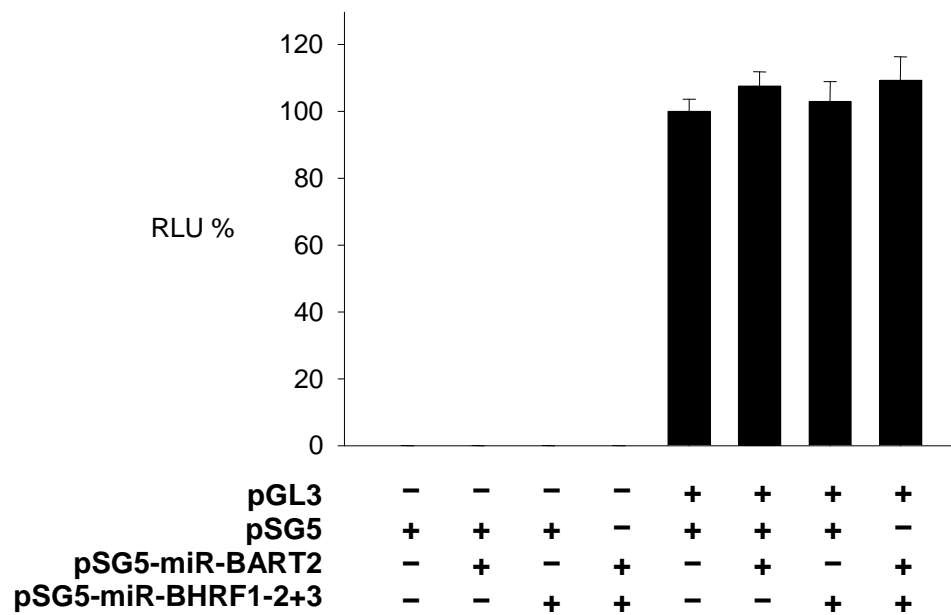


Abb. 29: Effekt mehrerer koexprimierter miRNAs auf pGL3

Gezeigt sind die Mittelwerte und ihre mittleren Fehler aus 3 unabhängigen Experimenten mit Doppelansätzen. Es wurden keine signifikanten Unterschiede beobachtet.

Es fanden sich keine signifikanten Effekte auf den Leervektor.

6.2.9.2 Einfluss von miR-BART2, -BHRF1-2 und -1-3 auf pGL3-BALF5-3'UTR

Abb. 30 zeigt das Ergebnis der Testung mit dem Reporterkonstrukt. Die Mengen transfizierter pSG5-abgeleiteter DNA sind jeweils identisch mit denen der zuvor gezeigten pGL3-Kontrolluntersuchungen (Kap. 6.2.9.1).

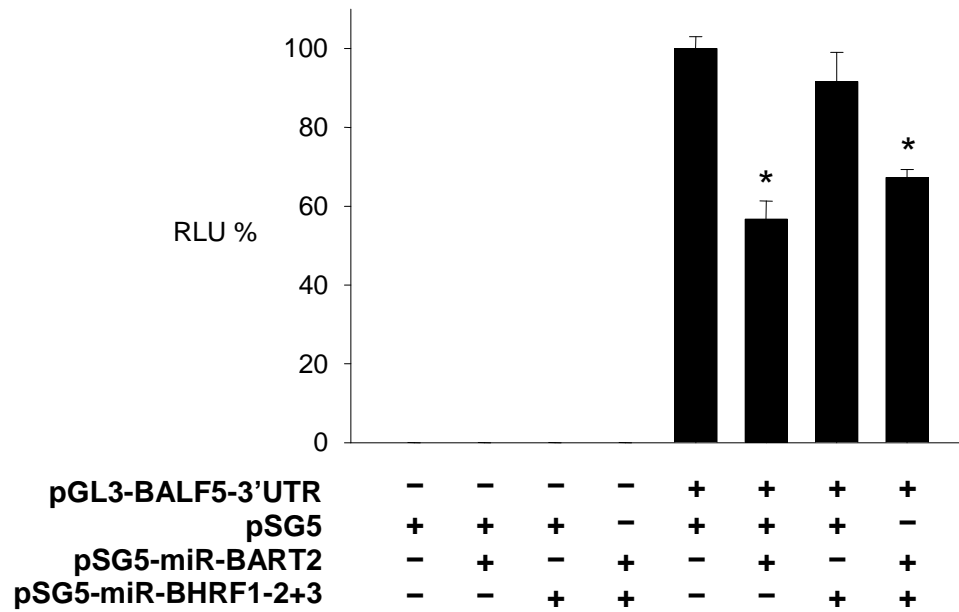


Abb. 30: Effekt mehrerer koexprimierter miRNAs auf pGL3-BALF5-3'UTR

Gezeigt sind die Mittelwerte und ihre mittleren Fehler aus 3 unabhängigen Experimenten mit Doppelansätzen. Erkennbar sind ein signifikanter Abfall von gut 40% bei der miR-BART2 ($p = 0,00026$) und der Kombination der drei miRNAs (gut 30%, $p = 0,00032$). Die Kombination der beiden BHRF1-2 und -1-3 zeigt dagegen eine geringe insignifikante Abnahme (unter 10%, $p = 0,26$).

Erwartungsgemäß fand sich eine signifikante Abnahme bei den miR-BART2-enthaltenden Ansätzen, wobei die Abnahme in den Ansätzen, die nur die miR-BART2 enthielten, am stärksten ausgeprägt war.

In der Konstellation mit nur BHRF-1-2 und -1-3 sieht man im Gegensatz zur vorherigen Testung in Kap. 6.2.8 (Abb. 28) keine signifikante Abnahme. Die hier gezeigten Ergebnisse beruhen allerdings wie in Kap. 6.2.9.1 beschrieben nicht auf den üblichen 0,8 μg DNA je Effektorplasmid, sondern nur auf der halben Menge.

Die Aktivitätsverminderung bei der Kombination aller drei getesteten miRNAs fiel geringer aus als bei der alleinigen miR-BART2. Damit wurde gerade das gegenteiliges Verhalten beobachtet, als man es beim Vorliegen einer synergistischen Suppression erwartet hätte.

6.3 Einfluss von miR-146 und miR-155 auf die LMP1-3'-UTR

6.3.1 Klonierung der LMP1-3'-UTR

Die zellulären miRNAs miR-146 und miR-155 werden von EBV induziert (Motsch *et al.*, 2007). Damit kommen sie als potenzielle Regulatoren an EBV-mRNAs in Frage. Um eine mögliche Interaktion mit der UTR des Latenten Membranprotein 1 (LMP1) von EBV zu untersuchen, wurde diese vollständig kloniert und das Reportergenkonstrukt mit pGL3-LMP1-3'UTR (s. Kap. 4.10.3.4) bezeichnet. Die Amplifikation der UTR zeigt die Abb. 31.

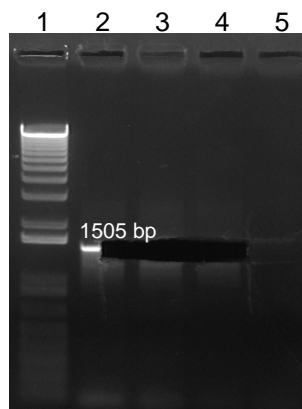


Abb. 31: Amplifikation der LMP1-3'-UTR auf Agarosegel

Der PCR-Ansatz mit M-ABA-Cosmiden als Template wurde in drei Aliquoten auf die Spuren 2-4 verteilt. In Spur 2 wurde zu Dokumentationszwecken die vorgefundene Bande nicht vollständig ausgeschnitten und bei der Weiterverarbeitung auf den verbliebenen Teil verzichtet. Ähnlich wie bei der Klonierung der EB2-3'-UTR gelang auch hier keine Amplifikation aus zellulärer Jijoye-DNA. Ein Aliquot dieses Ansatzes lief auf der Spur 5.

Das reisolierte Amplifikat wurde zum besseren Schneiden mit pGEM ligiert und das Zwischenkonstrukt vermehrt. Den Verdau der erzeugten Klone sieht man in Abb. 32.

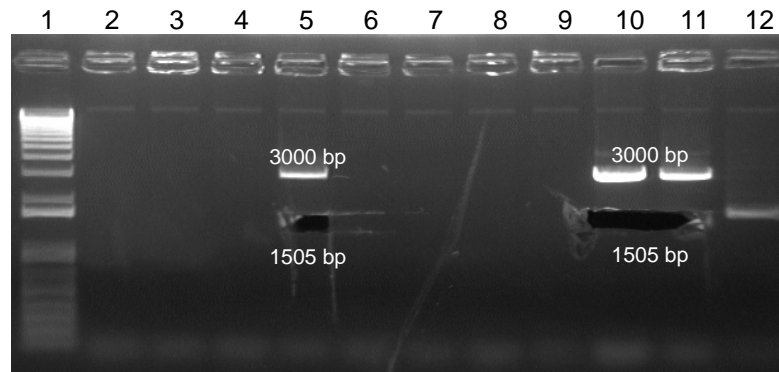


Abb. 32: *Xba*-I-Verdau erzeugter pGEM-Klone

Die Klone der Spuren 5, 10 und 11 enthielten das benötigte Insert, die entsprechenden Banden sind im Bild bereits zur Reisolation ausgeschnitten worden. Der Klon auf Spur 12 zeigte eine Bande, die sich ungefähr, aber nicht genau auf derselben Höhe wie die ausgeschnittenen Banden der anderen Klone befand. Sie wurde sicherheitshalber nicht verwendet.

Das Ergebnis des reisolierten und in pGL3 klonierten Inserts zeigt die folgende Abb. 33.

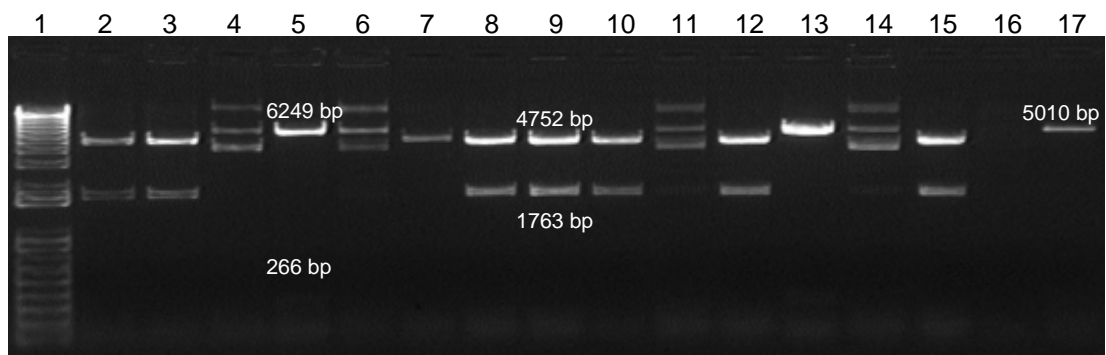


Abb. 33: Verdau potenziell LMP1-3'-UTR-enthaltender Klone mit *Eco* RI und *Bam* HI

Die Klone 4, 6, 11 und 14 zeigen ungeschnittenen Vektor mit den drei seinen Raumstrukturen entsprechenden Banden. Die Klone 2, 3, 8, 9, 10, 12 und 15 zeigen jeweils ein größeres Schnittfragment, das vom fast vollständigen pGL3 herrührt, und ein kleineres, das aus der LMP1-3'-UTR und dem restlichen kleinen Teil des pGL3-Vektors besteht. Diese Konstellation entspricht Klonen, die das Insert in der falschen Orientierung enthalten. Die Klone 5 und 13 enthielten das Insert in der gewünschten Orientierung. Ihre Fragmente bestanden aus dem fast vollständigen pGL3 mit Insert und einem kleinen, nur 266 bp langen

aus dem pGL3 herausgeschnitten Stück. Dieses Fragment ist auf dem Foto nur schwach sichtbar. Die schlechtere Darstellung kleiner DNA-Stücke, die sich bei entsprechender Laufzeit dem Ende des Gelstücks nähern, ist ein bekanntes Phänomen. Das für die Darstellung erforderliche Ethidium läuft aufgrund seiner positiven Ladung während der Elektrophorese genau in die andere Richtung wie die DNA, wodurch das Gel an seinem der Kathode zugewandten Ende zunehmend an Fluoreszenzfarbstoff verarmt. Bei den Klonen 7 und 17 zeigt sich linearisierter, kein Insert enthaltender pGL3.

6.3.1.1 Sequenz von pGL3-LMP1-3'UTR

Auch dieses neu hergestellte Konstrukt wurde vor der Benutzung im Bereich seines Inserts sequenziert. Es wurden die gleichen, noch in der pGL3-Sequenz bindenden Primer „5' pGL3 Seq“ und „3' pGL3 Seq BglII“ wie bei der Sequenzierung der EB2-3'-UTR-Konstrukte verwendet. Da allerdings das Insert mit rund 1,5 kbp wesentlich länger war, durfte man mit nur zwei, jeweils außerhalb des Inserts bindenden Primern kein Sequenzierungsergebnis von absoluter Sicherheit erwarten. Die Zuverlässigkeit einer Sequenzierung nimmt mit der Länge der von einem Primer ausgehend erstellten Sequenz ab, weshalb im konkreten Fall Ungenauigkeiten besonders in der Mitte des Inserts zu erwarten waren, wo sich die beiden erstellten Sequenzen mit ihren distalen Enden überlappen würden. Dies wurde akzeptiert, da für die LMP1-3'-UTR ohnehin keine konkret vorhergesagten Bindungsstellen für miRNAs bekannt waren. Dadurch könnten auch mit noch so großer Sicherheit identifizierte Mutationen im Insert nicht in ihrer Relevanz eingeschätzt werden und eine aufwendigere Sequenzierung, z.B. mit zwei Primerpaaren brächte wenig zusätzlichen Nutzen. Die grundsätzliche Orientierungsmöglichkeit ist dagegen auch mit den beiden alleinig verwendeten Primern vorhanden.

Bei dem ersten hergestellten Klon von pGL3-LMP1-3'UTR fanden sich im Sequenzierungsergebnis (nicht gezeigt) mehr als 40 Abweichungen von der Sequenz, die für die LMP1-3'-UTR im Wildtyp-Genom (Gene Bank Accession Number AJ507799.2) und Genom des B95-8-Stamms (Gene Bank Accession Number V01555.2) angegeben ist. Da nicht klar war, ob die klonierte LMP1-3'-UTR in den als Template verwendeten M-ABA-Cosmiden tatsächlich in dieser Form vorliegt

oder ob es zu diesen Mutationen während der Klonierung gekommen war, wurde die gesamte im vorigem Abschnitt beschriebene Klonierung wiederholt. Diesmal wurde allerdings bei der PCR anstelle der Taq-Polymerase ein Polymerase mit Korrekturlese-Funktion verwendet. Das neue pGL3-LMP1-3'UTR-Konstrukt wurde mit den gleichen Primern zweimal sequenziert, so dass vier Einzelsequenzen vorlagen. Die Ergebnisse wurden zusammengeführt und es fanden sich bis auf einzelne Ausnahmen genau die selben Abweichungen der LMP1-3'-UTR im Insert wie schon im zuvor hergestellten und verworfenen Klon. Da man jetzt davon ausgehen musste, dass die Sequenz im Insert des Klons weitestgehend mit der übereinstimmt, die im M-ABA-Template vorliegt, wurde dieser Klon vermehrt und für die Luciferase-Assays verwendet. Seine Sequenz ist hier angegeben.

... (bekannter und nicht sequenzierter pGL3-Promoter-Vektor bis Position 1889)

GATCCTCATA	AAGGCCAAGA	AGGGCGGAAA	GATCGCCGTG	TAAT TCTAGA
GGTGGAGATG	ATGACGACCC	CCACGGCCCA	G TTCAGCTAA	GCTACTATGA
CTAACCTTTC	TTTACTTCTA	GGCATTACCA	TGTCATAGGC	TTGCCTGACT
GACTCTCCCT	CCATTTACTG	GGAATGCTTT	AGCTAATCAC	CTTAACTGGC
ACACACTCCC	TTAGCCACAC	TGTCTGTCTA	GGCTGAAAAG	CCACATTCAT
ATTCTATTTT	AAAACAAGGG	GAAAGGAGGA	CATGCGAGAA	TTGGCAGACA
CCTTTACCGG	CCCCTTAACA	CACCACACAG	G TAGCGAGGC	CCCGGGCATT
GCCAGACTCC	GCCACCAACG	CCCCTGCGTT	GAACCCACCC	CTC AT ACACA
CATCAGACCT	CTGGACAACA	CAACTACAGG	GCAGATGAGG	CCCCTTACTT
CCACAGGGTA	CTGGCAT T CC	AGCGGGGGGC	CACATAC CA	CCTGTCTCCC
ACCCAGTAAC	T ACAGCAACT	TTGCTTTCCA	TCTTGTGCCA	ATACACATTT
GGATT CAGCC	CAAGCCACAC	CTAACTCATG	CA AGCAGAGG	CATGAACACC
TG GC GTTGAC	ACATTCTTTG	CGCATAAGCA	CTTTAATCCC	TCTCTCACAC
CCAGAAACTA	AGAGCTAG TC	CAAAACCTCC	ACACCTGTCC	TCGCTCATCT
TTCCACATTC	CTCTGGCCTT	C <u>TTT</u> C <u>CTT</u> G T	C <u>CTT</u> A <u>CT</u> G T A	T <u>-AAAAG</u> T <u>CC</u>
ACG <u>AAAA</u> CAG	CTGT <u>GC</u> CTCA	CT <u>CT</u> CGAGAT	GGTAC <u>AC</u> CGTC	CTG <u>CAG</u> CGTA
CTTTG <u>CTAG</u> A	GCAGC <u>AGT</u> CC	TCTGC <u>CTG</u> CG	GCCTG <u>-CC</u> GG	CTCTTT <u>CTAC</u>
GGAGACCA <u>-G</u>	CC <u>CTAG</u> CCAC	CCCTG <u>CCCCG</u>	AGGAC <u>CCAGA</u>	CGTCAGCA <u>AA</u>

<u>ACCTAGGACT</u>	ACTCCTGGTG	GTACCTCTGT	TGTTCCGGAC	TTTTATGCCT
GCTCCTCATC	TAAGAAGCCA	CCATGCGACC	GGGTAGACCA	CTGGCTGGAT
TCTACGCTAC	TCTCCGCCGT	TCCTTCAGAA	GAATGTCCAA	AAGGTCAAAG
AACAAGGCCA	AGAAGGAGCG	TGTCCCCGTG	GAAGACCGCC	CACCGACTCC
GATGCCCACC	AGCCAGCGAC	TGATCCGCAG	AAACGCGTTG	GGAGGAGGCG
TCCGCCCCGA	TGCGGAGGAC	TGCATCAAAC	GCTGCCACCC	CCTGGAGCCA
GCGCTGGGGG	TGTCAACAAA	GAACTTTGAC	CTGTTGTCCC	TGAGATGTGA
ATTGGGATGG	TGTGGATAAC	ATCTCCCGCT	AGATGGCGCC	CTTATTATTG
ATGTGACTTG	TGATGCAATA	AATAAAAGTA	CAGATAGATG	GCACTCTTAC
CTTCCTCTGC	CCGCTTCTTC	GTATATGTGT	TGAGATGAGT	CATCCCGTGG
AGAGTAGGGA	GGGGGAGGGA	GCCCGTCATT	CCCGTCGTGT	TGCAATCCCA
AGTACAAACT	TGGATCTTGG	TTTCCTAGTG	GTTGATAGTC	CGAGTGACGG
TCGCCATTGC	CCCAATCTGG	GTCCTCATAA	GGCGGTGGGG	GCTCTTCAGA
ATTCTAGAGT	CGGGGCGGCC	GGCCGCTTCG	AGCAGACATG	ATAAGATAC ...

(bekannter und nicht sequenzierter pGL3-Promoter-Vektor ab Position 1981)

Aufgrund der Länge des Inserts und der zweimaligen Sequenzierung haben in dem dargestellten zusammengeführten Ergebnis einzelne Abschnitte unterschiedliche Wertigkeit und sind entsprechend gekennzeichnet:

Die Ergebnisteile in schwarzer Schrift entsprechen jeweils dem Abschnitt, der bei beiden aufeinanderfolgenden Sequenzierungen mit demselben Primer identisch bis zur ersten Nicht-Übereinstimmung ausgegeben wurde. In dem dazwischen liegenden, orange gedruckten Teil kamen Abweichungen zwischen den Ergebnissen beider Sequenzierungen vor. Angegeben ist hier nur das Ergebnis der ersten Sequenzierung, und zwar die mittels des 5'-Primers (5' pGL3 Seq) generierte Sequenz. Wo immer diese allerdings nicht mit dem Ergebnis der entgegenkommenden 3'-Primer-Sequenz übereinstimmt, ist der betroffene Bereich unterstrichen. In dem 12 bp langen, in grauer Schrift dargestellten Teil war trotz der von der zählbaren Position her bestehenden Überlappung der 5'- mit der 3'-Primer-Sequenz keine Anpassung dieser beiden möglich (NCBI, Tool „BLAST 2 sequences“). Daher wird nur die mittels des 5'-Primers generierte Sequenz angegeben, ungeachtet der für die einzelnen Basen nicht bestimmaren Konformität zum 3'-Primer-Ergebnis.

Neben diesen sequenzierungsbedingten Unterscheidungen werden alle Abweichungen in der Sequenz von den Literaturangaben zur LMP1-3'-UTR (AJ507799.2 und V01555.2) durch Fettschrift hervorgehoben.

Die durch die Klonierungsprimer eingeführten Schnittstellen sind kursiv gesetzt und in den Farben gehalten, wie sie den Restriktionsenzymen entsprechen und auch in anderen Kapiteln verwendet werden.

6.3.2 Ergebnisse der Luciferase-Reportergen-Experimente

In den vorausgegangenen Experimenten mit EBV-miRNAs war die Konstellation pGL3 + miR-155 als Kontrolle hinreichend oft untersucht worden (s. Kap. 6.1.3 und 6.2). In den hier gezeigten Experimenten wurde daher auf sie verzichtet. Die Kontrollen mit der zuvor nicht getesteten miR-223 wurden dagegen wie gezeigt in allen Experimenten durchgeführt.

6.3.2.1 Einfluss der miR-223 auf den pGL3-Promoter-Vektor

In den Experimenten mit der LMP1-3'-UTR als potenzieller Ziel-mRNA wurde unter anderem der Einfluss der miR-155 untersucht. Als möglicher Effektor kam diese nicht mehr als „unspezifische“ Kontroll-miRNA in Frage. Es wurde daher eine andere klonierte zelluläre miRNA, die miR-223 verwendet. Um ihre Eignung zu überprüfen, wurde ihr Einfluss auf den pGL3-Vektor getestet. Das Ergebnis ist in Abb. 34 zu sehen.

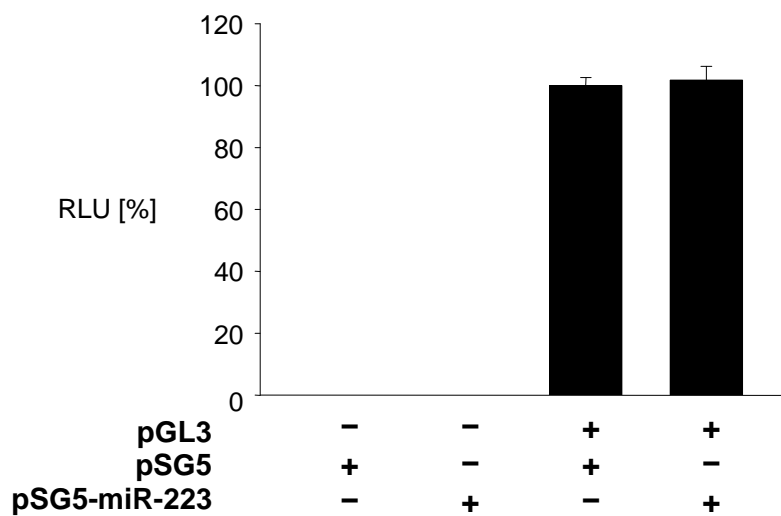


Abb. 34: Einfluss von pSG5-miR-223 auf den pGL3-Promoter-Vektor

Gezeigt sind die Mittelwerte und ihre mittleren Fehler aus 3 unabhängigen Experimenten mit Doppelansätzen. Der Mittelwert für die Kontransfektion mit pGL3 und pSG5 wurde auf 100% gesetzt. Ein Unterschied zwischen den beiden Luciferase-exprimierenden Konstellationen ist kaum zu erkennen. Für ihn ergibt sich ein p-Wert von 0,65.

Es fand sich kein signifikanter Einfluss auf die Luciferaseexpression.

6.3.2.2 Einfluss von miR-155 und miR-223 auf pGL3-LMP1-3'UTR

Die Abb. 35 zeigt die Testung der miR-155 als potenziellem Effektor und der miR-223 als Kontrolle mit pGL3-LMP1-3'UTR.

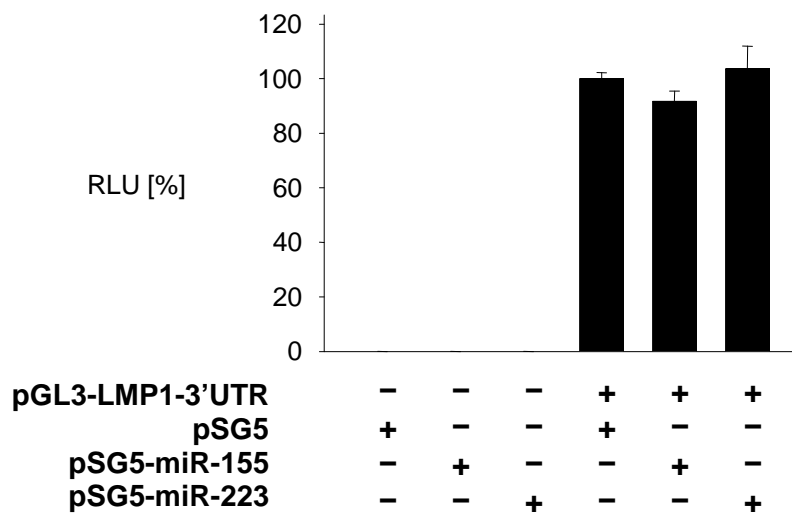


Abb. 35: Einfluss von pSG5-miR-155 und -223 auf pGL3-LMP1-3'UTR

Gezeigt sind die Mittelwerte und ihre mittleren Fehler aus 3 unabhängigen Experimenten mit Doppelansätzen. Bei der miR-155 findet sich ein Abnahme von unter 10%, die nicht signifikant ist ($p = 0,11$). Die Änderung der miR-223-Kontrolle ist gleichermaßen gering und insignifikant ($p = 0,68$).

Signifikante Veränderungen wurden nicht beobachtet.

6.3.2.3 Einfluss von miR-146 und miR-223 auf den pGL3-Promoter-Vektor

Die Testungen der miR-146 und der miR-223-Kontrolle am Leervektor sind in Abb. 36 zu sehen.

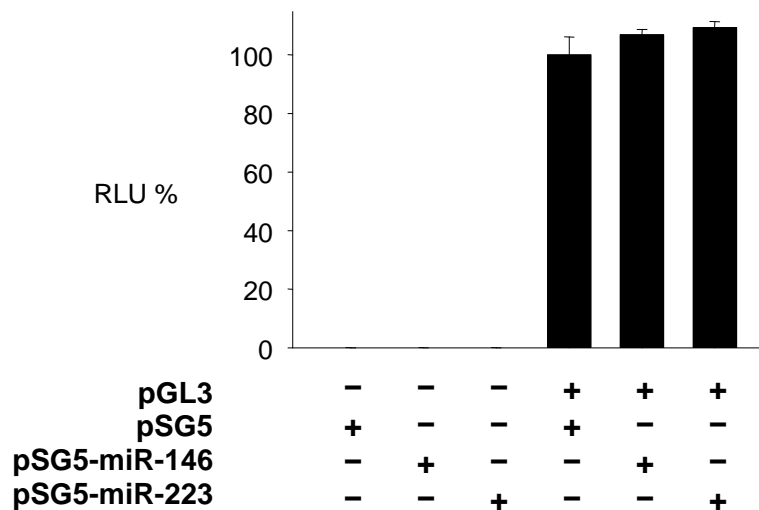


Abb. 36: Einfluss von pSG5-miR-146 und -223 auf den pGL3-Promoter-Vektor

Gezeigt sind die Mittelwerte und ihre mittleren Fehler aus zwei unabhängigen Experimenten mit Doppelansätzen. Sowohl bei der miR-146 als auch bei der miR-223 geringfügige Lichtemissionszunahmen von unter 10%, die nicht signifikant sind ($p = 0,38$ und $p = 0,14$).

Es fanden sich keine signifikanten Effekte.

6.3.2.4 Einfluss von miR-146 und miR-223 auf pGL3-LMP1-3'UTR

Die Messungen am eigentlichen Reporterkonstrukt zeigt die Abb. 37.

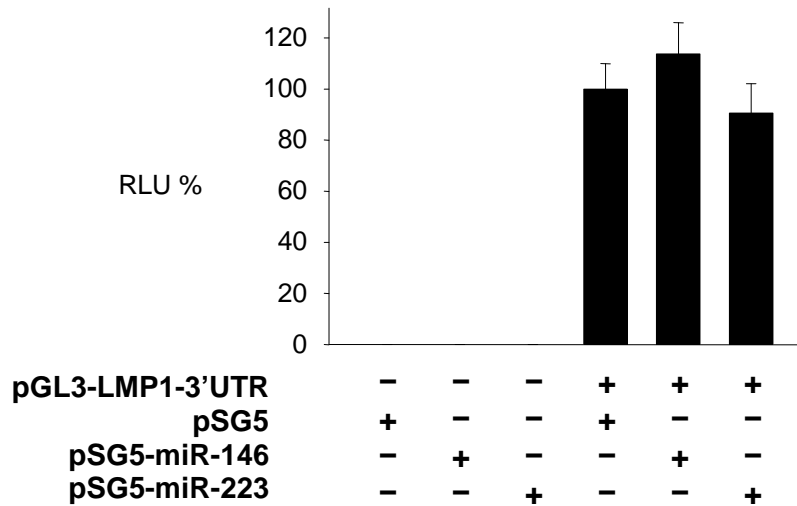


Abb. 37: Einfluss von pSG5-miR-146 und -223 auf pGL3-LMP1-3'UTR

Gezeigt sind die Mittelwerte und ihre mittleren Fehler aus zwei unabhängigen Experimenten mit Doppelansätzen. Bei der miR-146 ist ein knapp 15%iger Anstieg, bei der miR-223-Kontrolle eine Abnahme von rund 10% erkennbar. Beide Veränderungen sind nicht signifikant ($p = 0,57$ und $p = 0,55$).

Keiner der sichtbaren Unterschiede war größer als 15% oder signifikant.

7. Diskussion

7.1 Effekte bei als Kontrollen eingesetzten zellulären miRNAs

Die bei den Luciferaseassays als Kontrollen eingesetzten, zellulären miRNAs dienten als unspezifische Vergleichsmöglichkeit, um Veränderungen der Lichtemission in den eigentlich interessierenden Ansätzen besser beurteilen zu können. Zu diesem Zweck sollte bei ihnen idealerweise kein Einfluss auf die Luciferaseexpression des Reporters beobachtet werden. Dies war jedoch in den erhobenen Daten teilweise nicht der Fall. Insbesondere bei der miR-155 und der miR-122 zeigten sich zum Teil erhebliche, signifikante Veränderungen. Mögliche Gründe und Konsequenzen werden im Folgenden diskutiert.

7.1.1 Steigerung der Luciferaseaktivität bei miR-155

In den durchgeführten Messungen finden sich bei verschiedenen Reporterplasmiden Lichtemissionssteigerungen, wenn pSG5-miR-155 kotransfiziert ist (s. Kap. 6.1.3.1, 6.1.3.4). Wurden die Experimente sehr oft wiederholt, waren diese Anstiege teilweise auch signifikant (s. Kap. 6.1.3), so geschehen bei den Untersuchungen zu den beiden EB2-3'-UTR, wo als Datengrundlage 7 Experimente mit Doppelansätzen durchgeführt und damit für jede Konstellation 14 Ansätze untersucht worden waren. Die Datenmenge und entsprechende Signifikanz ($p = 0,00044$ bei pGL3 für die Daten in Abb. 17) lassen einen rein zufälligen Effekt unwahrscheinlich wirken.

7.1.1.1 Signifikanz vs. Plausibilität

Bei der Betrachtung muss bedacht werden, was die gefundene statistische Signifikanz ausdrückt. Ihr Vorliegen trifft eine Aussage zu der Möglichkeit, ob ein beobachtetes Phänomen durch Zufall zustande kam oder nicht. Wird das geforderte

Signifikanzniveau erreicht, so kann man mit der errechneten Irrtumswahrscheinlichkeit den Zufall ausschließen.

Über einen möglichen kausalen Zusammenhang erfährt man allerdings nichts. Die Plausibilität eines Mechanismus, den man aufgrund der unzufälligen Beobachtung dem Vorgang unterstellen möchte, muss unabhängig von der Statistik geprüft werden.

Angewandt auf den vorliegenden Fall scheint ein direkter Mechanismus der induzierten miR-155 auf die mRNA wenig wahrscheinlich. Eine Hochregulation durch eine miRNA wäre sehr ungewöhnlich, da die bislang bekannten Effekte von Wirts-miRNAs auf Viren in den meisten Fällen inhibitorisch oder nicht vorhanden waren (Cullen, 2006). Ein positiver Einfluss ist als Ausnahme lediglich für die leberspezifische miR-122 auf die Replikation des Hepatitis-C-Virus nachgewiesen (Jopling *et al.*, 2005; Cullen, 2006). Auch dort wurde aber kein direkter Einfluss auf die Translation oder die RNA-Stabilität gefunden, sondern als Ursache eine Transkriptionssteigerung der DNA beobachtet. Ein derartiger, sekundärer Mechanismus könnte allerdings auch hier zugrunde liegen: Da es sich bei der miR-155 um eine mindestens in Mäusen onkogene miRNA handelt (Costinean *et al.*, 2006; Tam & Dahlberg, 2006; Wiemer, 2007), wäre eine Induktion von Transkriptionsfaktoren denkbar. Ein vermehrter Faktor, der zur Expression der Luciferase von pGL3 benötigt wird, würde die Lichtemissionssteigerung bei unterschiedlichen Konstrukten wie auch dem unklonierten Leervektor erklären können. Dabei bliebe jedoch unklar, weshalb die Konstellation mit dem Leervektor nicht in allen Fällen Anstiege aufweist (Kap. 6.2) und warum auch bei den Experimenten mit der LMP1-3'UTR (Kap. 6.3.2.2), bei denen ebenfalls pGL3 als Reporterplasmid fungierte, keine Emissionssteigerung beobachtet wurde. Für den letzteren Fall müsste vielleicht berücksichtigt werden, dass die zur Genexpression benötigten Moleküle in der Zelle nicht unbegrenzt vorhanden sind. Da es sich bei pGL3-LMP1-3'UTR um das größte der verwendeten pGL3-Konstrukte handelt, könnte ein relativer Mangel beispielsweise an Nukleotiden bei der Transkription

auch die Luciferaseexpression beeinträchtigen. Diese Beschränkung wird aber beim Leervektor am allerwenigsten eine Rolle spielen und kann dort nicht als denkbare Lösung dienen.

Letzten Endes legen die Beobachtungen keine abschließende Erklärung der Effekte nahe. Gerade das uneinheitliche Verhalten derselben Konstellation aus pGL3 und pSG5-miR-155 zwischen verschiedenen Versuchsreihen lässt eine zusätzliche Modulation durch unbekannte Faktoren oder insgesamt komplexere Regulation vermuten.

Zusammengefasst muss angenommen werden, dass der beobachtete miR-155-Effekt am ehesten nicht auf einer, der im Interesse dieser Arbeit stehenden, spezifischen miRNA-mRNA-Interaktion beruht.

Es ist nicht einmal sicher, ob der Effekt überhaupt etwas mit der miR-155 im Speziellen oder gar miRNAs im Allgemeinen zu tun hat. Es ließe sich genauso gut über einen Mechanismus spekulieren der zwar durch das verwendete Plasmid pSG5-miR-155, aber nicht durch die mittels ihm exprimierte miR-155 vermittelt wird.

7.1.1.2 Signifikanz vs. Relevanz

Ein zweiter Aspekt, der signifikanzunabhängig hinterfragt werden muss, ist die Relevanz der Beobachtung. Sie ist keinesfalls schon dadurch gegeben, dass die Statistik das Phänomen als nicht zufällig identifiziert hat. Zum einen ist sie abhängig von der Fragestellung, die man untersucht, zum anderen können auch beliebig kleine und unwichtige Unterschiede signifikant werden. Dazu müssen lediglich die erhobenen Datenmengen groß genug und die Abweichungen wirklich nicht durch Zufall entstanden sein.

Die Fragen sind also, wie groß der gefundene Effekt ist und ob er für die interessierenden Vorgänge bedeutsam sein kann. Was die Effektgröße anbelangt, so wurden in der Konstellation mit dem pGL3-Leervektor (s. Abb. 17) ein Anstieg von bis zu fast 50%, im Fall mit pGL3-anti-EB2-3'UTR ein Anstieg von rund 30% und in den anderen Fällen keine signifikanten Effekte beobachtet. Die Stärke der

Zunahme spricht also nicht grundsätzlich gegen eine Bedeutsamkeit, dies tut dafür umso mehr der Kontext, in dem der Effekt auftrat:

Zum einen weist das Vorkommen bei den beiden verschiedenen Reportern auf die Unspezifität der Zunahme hin, vor allem aber sind die beiden beschriebenen Konstellationen mit pGL3 und pGL3-anti-EB2-3'UTR gerade diejenigen, die zwar zu Kontrollzwecken getestet wurden, aber (oder besser gerade deswegen) am allerwenigsten einer „physiologischen“ Situation von EBV-infizierten Zellen entsprechen. Der pGL3-Leervektor kommt als gentechnisches Werkzeug physiologisch nicht in EBV-positiven Zellen vor und enthielt auch keine zusätzlich eingeführte EBV-typische Sequenz. Das Konstrukt pGL3-anti-EB2-3'UTR enthielt zwar ein Insert, dass aus dem EBV-Genom stammt, aber dieses in umgekehrter Leserichtung, als der natürlichen und mutmaßlich funktionell bedeutsamen.

7.1.1.3 Beurteilung

Bezüglich des Auftretens von Lichtemissionssteigerungen durch das verwendete Effektorkonstrukt pSG5-miR-155 ergibt sich kein einheitliches Bild. Bei den unterschiedlichen Reporterkonstrukten waren Steigerungen jeweils vorhanden, nicht vorhanden oder traten nicht durchgehend auf.

Einen insignifikanten Anstieg durch pSG5-miR-155 findet man auch bei den Daten, die beim Nachweis der BALF5-3'-UTR-Regulation durch miR-BART2 beobachtet wurden (Barth *et al.*, 2008). Die dort nicht vorhandene Signifikanz ($p = 0,092$) könnte möglicherweise dadurch mitbedingt sein, dass die gezeigten Daten nur 4 Doppelexperimenten entstammen. Dazu passen würde, dass in der hier vorliegenden Arbeit signifikante Effekte durch pSG5-miR-155 nur in den Untersuchungen gesehen wurden, denen eine Datenmenge von 7 Doppelexperimenten zugrunde lag.

Daraus ergäbe sich eine weitere Schlussfolgerung: Wenn die sehr breite Datenmenge hauptsächlich dazu führt, dass unspezifische Effekte signifikant werden, ist eine beliebig häufige Wiederholung von Experimenten nicht sinnvoll (von

wirtschaftlichen Aspekten ganz zu schweigen). Die mögliche Überbewertung zwar vorhandener, aber geringer Effekte erweist sich als Nachteil, wohingegen spezifische und von ihrer Stärke her relevante Effekte, die sich nicht vorher schon bei geringerer Datenmenge angedeutet haben, wohl kaum neu auftreten werden.

Aus diesem Grund wurden in den Untersuchungen zur BALF5- (Kap. 6.2) und LMP1-3'-UTR (Kap. 6.3.2), die allesamt nach den EB2-3'UTR-Experimenten stattfanden, maximal 3 Doppelsexperimente je untersuchtem Effektorplasmid durchgeführt.

Zusammenfassend muss man feststellen, dass deutliche Hinweise darauf, dass pSG5-miR-155 die Luciferaseaktivität bei verschiedenen Reportergenkonstrukten steigern kann, bestehen.

Der Effekt ist aber unspezifisch, passt von seiner Richtung her nicht zu einer miRNA-mRNA-Interaktion und tritt nur in Kontrollen auf, die keine natürliche Situation EBV-infizierter Zellen abbilden. Daher war er – obgleich signifikant – für die Beantwortung der interessierenden Fragen nutzlos.

7.1.2 Abnahme der Luciferaseaktivität bei miR-122

Signifikante Effekte zeigten sich bei den Konstellationen mit dem Leervektor pGL3 und dem Konstrukt pGL3-BALF5-3'UTR (s. Kap. 6.2). Da es sich im Gegensatz zu den miR-155-Effekten um Abnahmen handelte, passten die Beobachtungen vordergründig besser zu einem durch miRNAs vermittelten Einfluss. Allerdings war auch hier aufgrund der nicht allein am Reporterkonstrukt, sondern ebenfalls am Leervektor auftretenden Effekte die Unspezifität offensichtlich. Die Luciferaseabnahme könnte dadurch hervorgerufen worden sein, dass miR-122 an zelluläre mRNAs bindet und dadurch Faktoren, die für pGL3 wichtig sind, entzieht. Dies wäre beispielsweise möglich, wenn die gebundene mRNA für entsprechende Produkte kodiert und gehemmt wird. Alternativ könnte es auch zu einer Steigerung der Transkription oder Translation kommen, was die benötigten Faktoren

verbrauchen würde. Eine Replikationssteigerung, die durch miR-122 vermittelt wird, wurde bereits für virale mRNA beschrieben (Jopling *et al.*, 2006).

Aufgrund der mangelnden Spezifität und ähnlicher Überlegungen wie bei miR-155 bezüglich der Relevanz für die Fragestellung war eine genauere Analyse des Effekts nicht sinnvoll. Weiterhin war die Ausprägung der Abnahmen so stark, dass sie in Kontrollansätzen nicht akzeptiert werden konnte. Beispielsweise war der Effekt auf pGL3-BALF5-3'UTR signifikant stärker ($p = 0,023$) als der in diesen Experimenten verifizierte miR-BART2 Effekt (s. Abb. 24), der als Prototyp für aufzuspürende weitere EBV-miRNA-Effekte betrachtet werden konnte. Damit machten die gefundenen Abnahmen die Nutzbarkeit der miR-122 als Kontrolle zunichte.

7.1.3 Verwendung der miR-155 als Kontroll-miRNA

Die miR-155 wurde trotz der teilweise beobachteten Emissionsteigerungen in allen Experimenten, in denen sie nicht als mutmaßlich spezifischer Effektor in Frage kam, als Kontrolle mitgeführt. Dafür sprachen die folgenden Gründe:

Der Effekt selber war zwar wie in Kap. 7.1.1 erläutert, völlig uninteressant, aber sein mögliches Auftreten dank der vorhandenen Daten bekannt. Dies machte das Effektorplasmid pSG5-miR-155 zu einer besser kalkulierbaren Größe, als es ein anderes, weniger oft getestetes Kontrollplasmid gewesen wäre. Das zeigte sich besonders, als als mögliche Alternative die miR-122 probiert wurde. Die dort auftretenden unspezifischen und in Kap. 7.1.2 diskutierten Effekte hätten die Interpretierbarkeit der Experimente deutlich erschwert, wenn nicht sicherheitshalber auch passende miR-155-Kontrollen durchgeführt worden wären. Im Gegensatz zu denen bei miR-155 waren die Effekte nicht nur wesentlich stärker ausgeprägt, sondern auch noch suppressiv. Damit war ihre Richtung identisch mit der der potenziellen spezifischen miRNA-Effekte, die aufgespürt werden und gerade von den Kontrollen abgegrenzt werden sollten. In diesem Zusammenhang hätte eine Verwendung der miR-122 mehr Schaden als Nutzen angerichtet.

Es empfahl sich daher, keine weiteren zellulären miRNAs als Kontrollen auszuprobieren, sondern die miR-155 zu verwenden, die sich bereits bei der Entdeckung des bis auf die Virusreplikationsebene verifizierten Effekts von miR-BART2 auf die BALF5-3'-UTR bewährt hatte (Barth *et al.*, 2008).

7.2 Beeinflussung der EB2-3'-UTR

Die EB2-3'-UTR war als potenzielles Target für die miR-BART2 vorhergesagt worden. Nach Kotransfektion des die vorausgesagten drei Bindungsstellen enthaltenden Reporters mit dem miR-BART2 exprimierenden Effektorplasmid ergab sich jedoch kein signifikanter Emissionsunterschied zu entsprechenden Ansätzen, in denen die miR-BART2 nicht exprimiert wurde (s. Abb. 19). Die entsprechenden Experimente wurden sieben Mal mit doppelten Ansätzen durchgeführt. Damit konnte die Vorhersage nicht bestätigt werden.

Für die analogen Experimente mit der antisense klonierten EB2-3'-UTR hatten keine direkten Zielvorhersagen, sondern die in Kap. 6.1.3.4 beschriebenen Überlegungen bestanden. Auch hier konnte bei gleicher Datenmenge keine Interaktion mit der miR-BART2 gefunden werden.

7.3 Beeinflussung der BALF5-3'-UTR

7.3.1 Einfluss durch B95-8-Stamm-EBV-miRNAs

Die bereits bekannte Regulation durch die miR-BART2 konnte auch in den vorliegenden Experimenten mit der vollständigen BALF5-3'-UTR gezeigt werden (Abb. 24). Für die darüber hinaus getesteten miRNAs miR-BART1, -BHRF-1-1, -1-2 und 1-3 wurde kein Effekt beobachtet (Abb. 22, 26, 28). Die gemeinsame Expression von miR-BART2, -BHRF1-2 und -BHRF-1-3 ergab einen Effekt, der geringer ausfiel, als derjenige bei alleiniger miR-BART2-Expression (Abb. 30). Damit ist in dieser Kombination auch kein synergistischer Effekt anzunehmen.

7.3.2 Einfluss durch pSG5-miR-122

Wie in Kap. 7.1.2 erläutert, konnte die miR-122 aufgrund deutlicher Verringerungen der Lichtemission nicht mehr als Kontrolle dienen. Eine Betrachtung unter dem Aspekt einer potenziell agierenden miRNA war dagegen möglich. Dabei fiel auf, dass die relativen Abnahmen in der Konstellation mit pGL3-BALF5-3'UTR durchgehend stärker ausfielen als in den Leervektoransätzen mit pGL3. Bei den BALF5-3'UTR-Ansätzen lagen die signifikante Abnahmen zwischen 45 und 70%, bei den Leervektoransätzen reichte das Spektrum von insignifikanten 20% bis hin zu signifikanten 40% Emissionsabnahme. Es könnte spekuliert werden, dass die Differenz zwischen beiden Konstellationen eine BALF5-3'UTR-spezifische Abnahme ausdrückt, die sich mit der unspezifischen Abnahme, wie man sie auch bei den Leervektoransätzen sieht, überlappt. Eine solche Suppression der BALF5-Polymerase durch miR-122 könnte womöglich *in vivo* eine effiziente Replikation des EBV in der Leber, wo die miR-122 ausschließlich exprimiert wird (Jopling *et al.*, 2006), behindern. Dies wäre eine Erklärung dafür, dass hepatische Formen nur in ca. 5% der Fälle (Herold, 2005) symptomatischer EBV-Infektionen vorkommen. Eine Möglichkeit für weitere Untersuchungen, die diese Vermutung überprüfen könnten, wäre eine Suche nach Mutanten von miR-122 und ob diese womöglich bei Patienten mit EBV-induzierten Hepatitis überzufällig häufig vorkommen.

7.4 Beeinflussung der LMP1-3'-UTR

Weder für die miR-146 noch die miR-155 konnte eine Regulation der LMP1-3'-UTR beobachtet werden. Zwischen den Effektorplasmid-enthaltenden und den Kontroll-Ansätzen fanden sich keine signifikanten Unterschiede (Kap. 6.3.2).

Das negative Ergebnis ist vereinbar mit neuen Erkenntnissen, die eine Suppression der LMP1-Expression durch miRNAs des ersten BART-Clusters beschreiben (Lo *et al.*, 2007). Diese Regulation durch virale miRNAs lässt im Nachhinein eine zusätzliche Suppression durch miRNAs der Zelle (des Wirts) unwahrscheinlich

wirken. Aus der LMP1-Regulation durch das BART-Cluster lassen sich noch weitere Überlegungen ableiten, die in Kap. 7.5.2 diskutiert werden.

7.5 Identifikation von miRNA-Zielen *in silico* und *in vivo*

7.5.1 Schwierigkeit der Vorhersage von miRNA-Zielen

Aufgrund des experimentellen Aufwands bei der Suche nach miRNA-Zielgenen und der ständig wachsenden Menge bekannter miRNAs sind softwaregenerierte Vorhersagen von großer Bedeutung. Zur Entwicklung der Algorithmen sind aber Informationen nötig, die nicht *in silico* gewonnen werden können. Aus den Eigenschaften gesicherter Zielsequenzen sowie Ergebnissen von Experimenten mit synthetischen miRNAs und Zielen lassen sich Voraussetzungen für das Finden weiterer Target-Sites ableiten (Brennecke *et al.*, 2005). Dieses Vorgehen setzt voraus, dass die zugrunde liegenden Daten repräsentativ für die Gesamtmenge sind, was angesichts der wenigen bekannten miRNA-Ziele möglicherweise nicht zutrifft. Eine Beschränkung durch nicht in allen Fällen notwendige Anforderungen würde dazu führen, dass Bindungspartner nicht entdeckt werden, ein Mangel an Kriterien oder deren Unspezifität könnte dagegen so viele Falschpositive produzieren, dass die Aussagen zu unverbindlich werden. Ersterem kann man begegnen, indem man auch 3'-UTRs kloniert und testet, für die keine direkten Vorhersagen bestehen, so wie es für die LMP1-3'-UTR durchgeführt wurde (Kap. 6.3). Dagegen legt letzteres, wie es bei den überprüften Voraussagen zu EB2 wahrscheinlich der Fall war (Kap. 6.1.3.3), eine kritische Prüfung der üblichen Prognosekriterien nahe.

So wird normalerweise davon ausgegangen, dass eine größere Komplementarität einer Sequenz zur miRNA deren Binden wahrscheinlicher macht, was durch den Vergleich der Bindungsenergien berücksichtigt wird. Allerdings gibt es Hinweise dafür, dass sich miRNAs weniger in Richtung maximaler Komplementarität als in Richtung optimierter Funktion entwickelt haben. Für siRNA konnte gezeigt werden,

dass einzelne Mismatches ein Schneiden der mRNA nicht *per se* verhindern und für miRNAs in Pflanzen wurde angenommen, dass geeignet lokalisierte Mismatches die Schneideeffizienz sogar erhöhen, indem sie die Freisetzung der geschnittenen mRNA aus dem RISC erleichtern (Tang *et al.*, 2003).

Weiteres Kriterium ist, ob mögliche Zielsequenzen zwischen verwandten Spezies konserviert sind. Dabei müssen die Programme im Einzelfall auch phylogenetische Besonderheiten berücksichtigen, die die Annahme einer Konservierung weniger sinnvoll machen würden. Ansonsten könnte eine bei Mensch und Maus vorkommende Sequenz, die beim Hund fehlt, eher als konserviert gelten als eine, die bei Mensch und Hund, aber nicht der Maus vorkommt. Ein solches Ergebnis würde zwar berücksichtigen, dass Mensch und Maus einen jüngeren gemeinsamen Vorfahren als Mensch und Hund haben, aber übersehen, dass aufgrund beschleunigter Evolution der Nager das menschliche Genom weniger mit dem der Maus als dem des Hundes verwandt ist (Lindblad-Toh *et al.*, 2005; Rajewsky, 2006b). Vergleichbare Situationen können gerade bei Organismen, deren verwandschaftliche Nähe und Zeitpunkt ihrer evolutionären Trennung weniger genau erforscht sind, problematisch sein. Schwierigkeiten kann auch der Umstand bieten, dass eine Konservierung zwischen weiter entfernt verwandten Arten besonders aussagekräftig ist, gerade dort aber die Wahrscheinlichkeit, dass Sequenzen verloren gegangen sind, am größten ist (Rajewsky, 2006b). Vor allem aber ist eine vorhandene Konservierung keine RNAi-spezifische Auffälligkeit, sondern konserviert wird schlicht alles, was wichtig ist und nicht ersetzt werden kann.

Das vielleicht am stärksten akzeptierte und gewichtete Vorhersagekriterium ist die Komplementarität im Bereich der Seed-Sequenz (Bartel, 2004). Ist diese vollständig gegeben, werden von Seiten des 3'-Endes der miRNA kaum noch Übereinstimmungen gefordert (Brennecke *et al.*, 2005). Mittlerweile kennt man allerdings eine zweite Klasse von Zielen, bei der die Anforderungen eher umgekehrt erfüllt werden: Eine imperfekte Bindung im Bereich des 5'-Endes wird durch stärkere Übereinstimmung im 3'-Bereich ausgeglichen (Rajewsky, 2006b). Zu erheblichen Zweifeln am Seed-Pairing-Konzept geben besonders die Untersuchungen von

Didiano und Hobert Anlass: Sie testeten mutmaßliche Ziele der miRNA lsy-6 in Zellen von *C. elegans*, in denen lsy-6 bereits natürlicherweise vorkommt. Die 13 getesteten Ziele hatten übereinstimmende Seed-Sequenzen und waren allesamt konserviert; bestätigt werden konnte im Gegensatz zur Positivkontrolle aber kein einziges (Didiano & Hobert, 2006). Die Autoren folgern, dass mindestens bei der lsy-6-miRNA das Vorliegen einer passenden Seed-Bindung kein verlässlicher Marker für das Vorliegen einer Zielsequenz ist.

7.5.2 Konsequenzen aus der LMP1-Regulation durch BART-miRNAs

Nach Abschluss der Experimente für diese Arbeit konnten Lo *et al.* zeigen, dass die miRNAs des ersten BART-Clusters gemeinsam die LMP1-Expression supprimieren (Lo *et al.*, 2007). Die Autoren geben eine Anzahl von 12 miRNAs an, die auf dem Cluster liegen, und klonierten eine 2 kbp lange DNA, die deren gleichzeitige Expression ermöglichte. Mit einem LMP1-Expressionsvektor, der auch die zugehörige 3'-UTR enthielt, konnte die verminderte Proteinmenge nachgewiesen werden.

Die Regulation derselben mRNA durch ein ganzes miRNA-Cluster, wirft allerdings, falls es sich nicht um eine Ausnahme handelt, weitere Fragen auf:

Zum einen, wenn eine solche Vielzahl von miRNAs an die gleiche mRNA bindet, um diese zu reprimieren, welchen Wert hat dann in den ungeprüften Fällen eine isolierte positive Vorhersage für eine einzelne miRNA? Für eine valide Vorhersage würde man wohl eher erwarten, dass im Vorfeld potenzielle Bindungsstellen für mehrere miRNAs und für diese womöglich jeweils mehr als eine Zielsequenz identifiziert werden können. In der Tat beschreiben die Autoren, dass sie vor Beginn der Klonierungen mittels geeigneter Suchprogramme 16 teilweise homologe Sequenzen für 7 der miRNAs des Clusters gefunden haben. Verallgemeinernd ließe sich vermuten, dass Vorhersagen viraler miRNA-Targets seltener falschpositiv sind, wenn sich für ein Ziel weitere potenziell bindende miRNAs, die im selben Kontext

exprimierbar wären, identifizieren lassen. Eine Ausnahme könnte der Fall sein, dass miRNA und Ziel vollständig komplementär zueinander sind. Wenn nämlich die mRNA geschnitten wird, bleibt die miRNA intakt und kann Erkennung und Schneiden weiterer mRNA-Moleküle vermitteln (Hutvagner & Zamore, 2002). Dies verläuft analog einer enzymatischen Reaktion, bei der das Enzym unverändert bleibt oder jedesmal regeneriert wird. Die resultierende Effizienzsteigerung könnte das Vorhandensein weiterer bindender miRNAs weniger wichtig machen.

Ein weitere Überlegung betrifft weniger die Vorhersage als die experimentelle Validierung eines potenziellen Ziels: Wenn man die vorhergesagten und tatsächlich funktionell bedeutsamen miRNAs einzeln testet, wie wahrscheinlich ist es überhaupt, dass man im Luciferaseassay einen Effekt sieht? Möglicherweise ist der Beitrag einer einzelnen miRNA zu gering, um mit vertretbarem Aufwand (realisierbarer Zahl von Experimenten) einen signifikanten Effekt sehen zu können. Lo *et al.* haben vor der Klonierung des gesamten Clusters vier miRNAs einzeln jeweils an Reportern, die die vorhergesagten Zielsequenzen enthielten, getestet. Dabei konnten sie für drei miRNAs eine Interaktion nachweisen, für die vierte der dagegen nicht. Diese Ausbeute scheint akzeptabel, wenn man außer Acht lässt, dass die Auswahl der getesteten miRNAs wohl kaum zufällig war. Es boten sich sinnvollerweise die am wahrscheinlichsten bindenden miRNAs an, und die Tatsache, dass die vier Getesteten 10 der 16 potenziellen Bindungsstellen abdeckten, legt nahe, dass die Auswahl genau so erfolgte.

Eine Folgerung dieser Überlegungen könnte sein, dass die Vorhersagen nicht alleine die mechanistische Interaktionswahrscheinlichkeit der einzelnen miRNA, ausgedrückt etwa durch Komplementarität und Bindungsenergie, berücksichtigen sollten. Eine höhere Bewertung, wenn weitere Vorhersagen, die dasselbe Transkript betreffen, vorhanden sind, wäre ein Versuch, den unbekannten funktionellen Zusammenhängen gerecht zu werden.

Auf der experimentellen Seite dagegen könnte die Koexpression mehrerer potenzieller Effektor-miRNAs sinnvoll zu sein, wie sie auch schon in Teilen dieser Arbeit getestet wurde (Kap. 6.2.9).

7.5.3 Unzuverlässigkeit derzeitiger Vorhersagen

Unter den getesteten mRNA-Sequenzen, konnte keine der verwendeten miRNAs als Ziel bestätigt werden. Dass auch bei den für die EB2-vorhergesagten Zielsequenzen keine Interaktion beobachtet wurde, ist vereinbar mit der Ansicht, dass die bisherigen *In-silico*-Vorhersagen nicht zuverlässig sind.

Dass miRNAs klein sind und nicht vollständig komplementär binden müssen, scheint für falschpositive Treffer zu prädestinieren. Dies findet auch Ausdruck darin, dass bereits kleine Änderungen in den Algorithmen ein starke Änderung der Vorhersagen bewirken (Rajewsky, 2006b). Die große Anzahl verfügbarer Programme, ließe sich auch in der Richtung deuten, dass keines optimal funktioniert.

Eine andere Erklärung böte die Vermutung, dass miRNA-Ziele nur in einem spezifischen zellulären Kontext funktionieren (Rajewsky, 2006a). Spekulieren ließe sich über Wirkungen nur bei bestimmten Zelltypen, Raumstrukturen der Nukleinsäuren und beteiligten Proteine, An- oder Abwesenheit von Kofaktoren oder im Rahmen anderer Regulationsvorgänge. Eine derartige kontextabhängige Funktion der getesteten Zielsequenzen wäre natürlich weiterhin möglich. Ohne zusätzliche Hinweise lässt sich dies aber kaum nachweisen, da die Zahl denkbarer Konstellationen nicht begrenzt ist.

Computergenerierten Zielvorhersagen wären hierfür nicht dienlich, solange sie keine Angaben zu dem Kontext machen, in dem sie zutreffen könnten.

Angeichts der Schwierigkeiten der computergestützten Identifikation miRNA-kontrollierter Genprodukte, ist die Notwendigkeit experimenteller Untersuchungen offensichtlich. Weitere gesicherte Erkenntnisse könnten auch die Entwicklung besserer Algorithmen ermöglichen, die den tatsächlichen Vorgängen *in vivo* besser

gerecht werden. Dazu würden auch negative Ergebnisse beitragen, sofern sie *in vivo* gewonnen wurden.

Gerade im Fall des Epstein-Barr-Virus mit seiner Rolle in der Entstehung maligner Erkrankungen wäre ein besseres Verständnis von großer Wichtigkeit.

Hoffentlich konnte die vorliegende Arbeit dazu einen Beitrag leisten.

8. Literaturverzeichnis

1. **Aiyar A, Tyree C, Sugden B. 1998.** The plasmid replicon of EBV consists of multiple cis-acting elements that facilitate DNA synthesis by the cell and a viral maintenance element. *EMBO J.* **17:** 6394-6403.
2. **Alfieri C, Birkenbach M, Kieff E. 1991.** Early events in Epstein-Barr virus infection of human B lymphocytes. *Virology* **181:** 595-608.
3. **Arrand JR, Rymo L, Walsh JE, Bjorck E, Lindahl T, Griffin BE. 1981.** Molecular cloning of the complete Epstein-Barr virus genome as a set of overlapping restriction endonuclease fragments. *Nucleic Acids Res.* **9:** 2999-3014.
4. **Baer R, Bankier AT, Biggin MD, Deininger PL, Farrell PJ, Gibson TJ, Hatfull G, Hudson GS, Satchwell SC, Seguin C, . 1984.** DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature* **310:** 207-211.
5. **Bartel B, Bartel DP. 2003.** MicroRNAs: at the root of plant development? *Plant Physiol* **132:** 709-717.
6. **Bartel DP. 2004.** MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116:** 281-297.
7. **Barth S, Pfuhl T, Mamiani A, Ehse C, Roemer K, Kremmer E, Jaker C, Hock J, Meister G, Grasser FA. 2008.** Epstein-Barr virus-encoded microRNA miR-BART2 down-regulates the viral DNA polymerase BALF5. *Nucleic Acids Res.* **36:** 666-675.
8. **Bhattacharyya SN, Habermacher R, Martine U, Closs EI, Filipowicz W. 2006.** Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. *Cell* **125:** 1111-1124.
9. **Birnboim HC, Doly J. 1979.** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7:** 1513-1523.
10. **Bolivar F, Rodriguez RL, Greene PJ, Betlach MC, Heynker HL, Boyer HW, Crosa JH, Falkow S. 1992.** Construction and

characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. 1977. *Biotechnology* **24**: 153-171.

11. **Bornkamm GW, Hudewentz J, Freese UK, Zimmer U. 1982.** Deletion of the nontransforming Epstein-Barr virus strain P3HR-1 causes fusion of the large internal repeat to the DSL region. *J. Virol.* **43**: 952-968.
12. **Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. 2005.** Principles of microRNA-target recognition. *PLoS.Biol.* **3**: e85.
13. **BURKITT D. 1958.** A sarcoma involving the jaws in African children. *Br.J.Surg.* **46**: 218-223.
14. **BURKITT D, O'CONOR GT. 1961.** Malignant lymphoma in African children. I. A clinical syndrome. *Cancer* **14**: 258-269.
15. **Cai X, Schafer A, Lu S, Bilello JP, Desrosiers RC, Edwards R, Raab-Traub N, Cullen BR. 2006.** Epstein-Barr virus microRNAs are evolutionarily conserved and differentially expressed. *PLoS.Pathog.* **2**: e23.
16. **Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM. 2002.** Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **99**: 15524-15529.
17. **Chaconas G, van de Sande JH. 1980.** 5'-32P labeling of RNA and DNA restriction fragments. *Methods Enzymol.* **65**: 75-85.
18. **Chen I, Dubnau D. 2004.** DNA uptake during bacterial transformation. *Nat.Rev.Microbiol.* **2**: 241-249.
19. **Clark JM. 1988.** Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* **16**: 9677-9686.
20. **Costinean S, Zanesi N, Pekarsky Y, Tili E, Volinia S, Heerema N, Croce CM. 2006.** Pre-B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high-grade lymphoma in E(mu)-miR155 transgenic mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **103**: 7024-7029.

21. **Cullen BR. 1987.** Use of eukaryotic expression technology in the functional analysis of cloned genes. *Methods Enzymol.* **152**: 684-704.
22. **Cullen BR. 2006.** Viruses and microRNAs. *Nat.Genet.* **38 Suppl**: S25-S30.
23. **Delecluse HJ, Feederle R, O'Sullivan B, Taniere P. 2007.** Epstein Barr virus-associated tumours: an update for the attention of the working pathologist. *J.Clin.Pathol.* **60**: 1358-1364.
24. **Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ. 2004.** Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* **432**: 231-235.
25. **Didiano D, Hobert O. 2006.** Perfect seed pairing is not a generally reliable predictor for miRNA-target interactions. *Nat.Struct.Mol.Biol.* **13**: 849-851.
26. **Dörries R. 2002.** Virion und Virus. In: Hof H, Dörries R, eds. *Medizinische Mikrobiologie.* Stuttgart: Thieme, 78-81.
27. **DuBridge RB, Tang P, Hsia HC, Leong PM, Miller JH, Calos MP. 1987.** Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol.Cell Biol.* **7**: 379-387.
28. **Dugaiczyk A, Boyer HW, Goodman HM. 1975.** Ligation of EcoRI endonuclease-generated DNA fragments into linear and circular structures. *J.Mol.Biol.* **96**: 171-184.
29. **EPSTEIN MA, ACHONG BG, BARR YM. 1964.** VIRUS PARTICLES IN CULTURED LYMPHOBLASTS FROM BURKITT'S LYMPHOMA. *Lancet* **1**: 702-703.
30. **Esau C, Davis S, Murray SF, Yu XX, Pandey SK, Pear M, Watts L, Booten SL, Graham M, McKay R, Subramaniam A, Propp S, Lollo BA, Freier S, Bennett CF, Bhanot S, Monia BP. 2006.** miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell Metab* **3**: 87-98.
31. **Fazi F, Rosa A, Fatica A, Gelmetti V, De Marchis ML, Nervi C, Bozzoni I. 2005.** A minicircuitry comprised of microRNA-223 and transcription factors NFI-A and C/EBPalpha regulates human granulopoiesis. *Cell* **123**: 819-831.

32. **Felli N, Fontana L, Pelosi E, Botta R, Bonci D, Facchiano F, Liuzzi F, Lulli V, Morsilli O, Santoro S, Valtieri M, Calin GA, Liu CG, Sorrentino A, Croce CM, Peschle C. 2005.** MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **102**: 18081-18086.
33. **Filipowicz W, Jaskiewicz L, Kolb FA, Pillai RS. 2005.** Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. *Curr.Opin.Struct.Biol.* **15**: 331-341.
34. **Garzon R, Pichiorri F, Palumbo T, Iuliano R, Cimmino A, Aqeilan R, Volinia S, Bhatt D, Alder H, Marcucci G, Calin GA, Liu CG, Bloomfield CD, Andreeff M, Croce CM. 2006.** MicroRNA fingerprints during human megakaryocytopoiesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **103**: 5078-5083.
35. **Gerber P, Lucas S, Nonoyama M, Perlin E, Goldstein LI. 1972.** Oral excretion of Epstein-Barr virus by healthy subjects and patients with infectious mononucleosis. *Lancet* **2**: 988-989.
36. **Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. 1977.** Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J.Gen.Virol.* **36**: 59-74.
37. **Gruffat H, Batisse J, Pich D, Neuhierl B, Manet E, Hammerschmidt W, Sergeant A. 2002.** Epstein-Barr virus mRNA export factor EB2 is essential for production of infectious virus. *J.Virol.* **76**: 9635-9644.
38. **Grundhoff A, Sullivan CS, Ganem D. 2006.** A combined computational and microarray-based approach identifies novel microRNAs encoded by human gamma-herpesviruses. *RNA* **12**: 733-750.
39. **Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. 2000.** An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* **404**: 293-296.
40. **Han J, Lee Y, Yeom KH, Kim YK, Jin H, Kim VN. 2004.** The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev.* **18**: 3016-3027.

41. **Heilmann J. 2007.** Moderne Bioassay-Methoden. In: Hänsel R., Sticher O., eds. *Pharmakognosie – Phytopharmazie*. Heidelberg: Springer Medizin Verlag, 138-140.
42. **Henle G, Henle W, Diehl V. 1968.** Relation of Burkitt's tumor-associated herpes-type virus to infectious mononucleosis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **59**: 94-101.
43. **Herold G. 2005.** Infektionskrankheiten. In: Herold G, ed. *Innere Medizin*. Köln: 718-778.
44. **Herrmann K, Niedobitek G. 2003.** Epstein-Barr virus-associated carcinomas: facts and fiction. *J.Pathol.* **199**: 140-145.
45. **Hinuma Y, Konn M, Yamaguchi J, Wudarski DJ, Blakeslee JR, Jr., Grace JT, Jr. 1967.** Immunofluorescence and herpes-type virus particles in the P3HR-1 Burkitt lymphoma cell line. *J.Virol.* **1**: 1045-1051.
46. **Hu G. 1993.** DNA polymerase-catalyzed addition of nontemplated extra nucleotides to the 3' end of a DNA fragment. *DNA Cell Biol.* **12**: 763-770.
47. **Hurley EA, Thorley-Lawson DA. 1988.** B cell activation and the establishment of Epstein-Barr virus latency. *J.Exp.Med.* **168**: 2059-2075.
48. **Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Balint E, Tuschl T, Zamore PD. 2001.** A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* **293**: 834-838.
49. **Hutvagner G, Zamore PD. 2002.** A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* **297**: 2056-2060.
50. **John B, Enright AJ, Aravin A, Tuschl T, Sander C, Marks DS. 2004.** Human MicroRNA targets. *PLoS.Biol.* **2**: e363.
51. **Jopling CL, Norman KL, Sarnow P. 2006.** Positive and negative modulation of viral and cellular mRNAs by liver-specific microRNA miR-122. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.* **71**: 369-376.

52. **Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, Lemon SM, Sarnow P. 2005.** Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science* **309**: 1577-1581.
53. **Kaufman DL, Evans GA. 1990.** Restriction endonuclease cleavage at the termini of PCR products. *Biotechniques* **9**: 304, 306.
54. **Kaye KM, Izumi KM, Kieff E. 1993.** Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is essential for B-lymphocyte growth transformation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **90**: 9150-9154.
55. **Kieff E, Levine J. 1974.** Homology between Burkitt herpes viral DNA and DNA in continuous lymphoblastoid cells from patients with infectious mononucleosis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **71**: 355-358.
56. **Kieff E, Rickinson A. 2006.** Epstein-Barr Virus and Its Replication. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2603-2654.
57. **Kim VN, Nam JW. 2006.** Genomics of microRNA. *Trends Genet.* **22**: 165-173.
58. **Kushner S. 1978.** An improved method for transformation of *Escherichia coli* with coli-derived plasmids. In: Boyer H.W., Nicosia S, eds. *Genetic Engineering: International Symposium Proceedings*. Amsterdam: Elsevier.
59. **Lecellier CH, Dunoyer P, Arar K, Lehmann-Che J, Eyquem S, Himber C, Saib A, Voinnet O. 2005.** A cellular microRNA mediates antiviral defense in human cells. *Science* **308**: 557-560.
60. **Lederberg EM, Cohen SN. 1974.** Transformation of *Salmonella typhimurium* by plasmid deoxyribonucleic acid. *J.Bacteriol.* **119**: 1072-1074.
61. **Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. 2005.** Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* **120**: 15-20.
62. **Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. 2003.** Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* **115**: 787-798.
63. **Lindblad-Toh K, Wade CM, Mikkelsen TS, Karlsson EK, Jaffe DB, Kamal M, Clamp M, Chang JL, Kulbokas EJ, III, Zody MC,**

Mauceli E, Xie X, Breen M, Wayne RK, Ostrander EA, Ponting CP, Galibert F, Smith DR, DeJong PJ, Kirkness E, Alvarez P, Biagi T, Brockman W, Butler J, Chin CW, Cook A, Cuff J, Daly MJ, DeCaprio D, Gnerre S, Grabherr M, Kellis M, Kleber M, Bardeleben C, Goodstadt L, Heger A, Hitte C, Kim L, Koepfli KP, Parker HG, Pollinger JP, Searle SM, Sutter NB, Thomas R, Webber C, Baldwin J, Abebe A, Abouelleil A, Aftuck L, Ait-Zahra M, Aldredge T, Allen N, An P, Anderson S, Antoine C, Arachchi H, Aslam A, Ayotte L, Bachantsang P, Barry A, Bayul T, Benamara M, Berlin A, Bessette D, Blitshteyn B, Bloom T, Blye J, Boguslavskiy L, Bonnet C, Boukhgalter B, Brown A, Cahill P, Calixte N, Camarata J, Cheshatsang Y, Chu J, Citroen M, Collymore A, Cooke P, Dawoe T, Daza R, Decktor K, DeGray S, Dhargay N, Dooley K, Dooley K, Dorje P, Dorjee K, Dorris L, Duffey N, Dupes A, Egbiremolen O, Elong R, Falk J, Farina A, Faro S, Ferguson D, Ferreira P, Fisher S, FitzGerald M, Foley K, Foley C, Franke A, Friedrich D, Gage D, Garber M, Gearin G, Giannoukos G, Goode T, Goyette A, Graham J, Grandbois E, Gyaltzen K, Hafez N, Hagopian D, Hagos B, Hall J, Healy C, Hegarty R, Honan T, Horn A, Houde N, Hughes L, Hunnicutt L, Husby M, Jester B, Jones C, Kamat A, Kanga B, Kells C, Khazanovich D, Kieu AC, Kisner P, Kumar M, Lance K, Landers T, Lara M, Lee W, Leger JP, Lennon N, Leuper L, LeVine S, Liu J, Liu X, Lokyitsang Y, Lokyitsang T, Lui A, Macdonald J, Major J, Marabella R, Maru K, Matthews C, McDonough S, Mehta T, Meldrim J, Melnikov A, Meneus L, Mihalev A, Mihova T, Miller K, Mittelman R, Mlenga V, Mulrain L, Munson G, Navidi A, Naylor J, Nguyen T, Nguyen N, Nguyen C, Nguyen T, Nicol R, Norbu N, Norbu C, Novod N, Nyima T, Olandt P, O'Neill B, O'Neill K, Osman S, Oyono L, Patti C, Perrin D, Phunkhang P, Pierre F, Priest M, Rachupka A, Raghuraman S, Rameau R, Ray V, Raymond C, Rege F, Rise C, Rogers J, Rogov P, Sahalie J, Settipalli S, Sharpe T, Shea T, Sheehan M, Sherpa N, Shi J, Shih D, Sloan J, Smith C, Sparrow T, Stalker J, Stange-Thomann N, Stavropoulos S, Stone C, Stone S, Sykes S, Tchuinga P, Tenzing P, Tesfaye S, Thoulutsang D, Thoulutsang Y, Topham K, Topping I, Tsamla T, Vassiliev H, Venkataraman V, Vo A, Wangchuk T, Wangdi T, Weiland M, Wilkinson J, Wilson A, Yadav S, Yang S, Yang X, Young G, Yu Q, Zainoun J, Zembek L, Zimmer A, Lander ES. 2005. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature* **438**: 803-819.

64. **Liu J, Valencia-Sanchez MA, Hannon GJ, Parker R. 2005.** MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat.Cell Biol.* **7**: 719-723.
65. **Lo AK, To KF, Lo KW, Lung RW, Hui JW, Liao G, Hayward SD. 2007.** Modulation of LMP1 protein expression by EBV-encoded microRNAs. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **104**: 16164-16169.
66. **Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. 2004.** Nuclear export of microRNA precursors. *Science* **303**: 95-98.
67. **Motsch N, Pfuhl T, Mrazek J, Barth S, Grasser FA. 2007.** Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 (LMP1) induces the expression of the cellular microRNA miR-146a. *RNA Biol.* **4**: 131-137.
68. **Mrazek J, Kreutmayer SB, Grasser FA, Polacek N, Huttenhofer A. 2007.** Subtractive hybridization identifies novel differentially expressed ncRNA species in EBV-infected human B cells. *Nucleic Acids Res.* **35**: e73.
69. **Mülhardt C. 2006.** *Molekularbiologie/Genomics*. Heidelberg: Elsevier Spektrum Akademischer Verlag.
70. **Murray PG. 2006.** Epstein-Barr virus in breast cancer: artefact or aetiological agent? *J.Pathol.* **209**: 427-429.
71. **Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. 1990.** Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* **2**: 279-289.
72. **Pellett PE, Roizman B. 2006.** Herpesviridae: A Brief Introduction. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2479-2499.
73. **Pfeffer S, Zavolan M, Grasser FA, Chien M, Russo JJ, Ju J, John B, Enright AJ, Marks D, Sander C, Tuschl T. 2004.** Identification of virus-encoded microRNAs. *Science* **304**: 734-736.
74. **Pillai RS, Bhattacharyya SN, Filipowicz W. 2007.** Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms? *Trends Cell Biol.* **17**: 118-126.

75. **Polack A, Hartl G, Zimmer U, Freese UK, Laux G, Takaki K, Hohn B, Gissmann L, Bornkamm GW. 1984.** A complete set of overlapping cosmid clones of M-ABA virus derived from nasopharyngeal carcinoma and its similarity to other Epstein-Barr virus isolates. *Gene* **27**: 279-288.
76. **Pope JH, Horne MK, Scott W. 1968.** Transformation of foetal human leukocytes in vitro by filtrates of a human leukaemic cell line containing herpes-like virus. *Int.J.Cancer* **3**: 857-866.
77. **Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J, Kuwajima S, Ma X, Macdonald PE, Pfeffer S, Tuschl T, Rajewsky N, Rorsman P, Stoffel M. 2004.** A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature* **432**: 226-230.
78. **Pritchett RF, Hayward SD, Kieff ED. 1975.** DNA of Epstein-Barr virus. I. Comparative studies of the DNA of Epstein-Barr virus from HR-1 and B95-8 cells: size, structure, and relatedness. *J.Virol.* **15**: 556-559.
79. **Rajewsky N. 2006a.** L(ou)sy miRNA targets? *Nat.Struct.Mol.Biol.* **13**: 754-755.
80. **Rajewsky N. 2006b.** microRNA target predictions in animals. *Nat.Genet.* **38 Suppl**: S8-13.
81. **Rand TA, Petersen S, Du F, Wang X. 2005.** Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell* **123**: 621-629.
82. **Rickinson A, Kieff E. 2006.** Epstein-Barr Virus. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2655-2700.
83. **Rowe M, Young LS, Cadwallader K, Petti L, Kieff E, Rickinson AB. 1989.** Distinction between Epstein-Barr virus type A (EBNA 2A) and type B (EBNA 2B) isolates extends to the EBNA 3 family of nuclear proteins. *J.Virol.* **63**: 1031-1039.
84. **Sambrook S, Russel DW. 2001a.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
85. **Sambrook S, Russel DW. 2001b.** Quantitation of nucleic acids. In: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, A8.19-A8.20.

86. **Sample J, Young L, Martin B, Chatman T, Kieff E, Rickinson A, Kieff E. 1990.** Epstein-Barr virus types 1 and 2 differ in their EBNA-3A, EBNA-3B, and EBNA-3C genes. *J. Virol.* **64**: 4084-4092.
87. **Scharf SJ, Horn GT, Erlich HA. 1986.** Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequences. *Science* **233**: 1076-1078.
88. **Sen GL, Blau HM. 2005.** Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. *Nat. Cell Biol.* **7**: 633-636.
89. **Sgaramella V, van de Sande JH, Khorana HG. 1970.** Studies on polynucleotides, C. A novel joining reaction catalyzed by the T4-polynucleotide ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **67**: 1468-1475.
90. **SHEIN HM, ENDERS JF. 1962.** Transformation induced by simian virus 40 in human renal cell cultures. I. Morphology and growth characteristics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **48**: 1164-1172.
91. **Sixbey JW, Nedrud JG, Raab-Traub N, Hanes RA, Pagano JS. 1984.** Epstein-Barr virus replication in oropharyngeal epithelial cells. *N. Engl. J. Med.* **310**: 1225-1230.
92. **Skare J, Strominger JL. 1980.** Cloning and mapping of BamHI endonuclease fragments of DNA from the transforming B95-8 strain of Epstein-Barr virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **77**: 3860-3864.
93. **Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D. 2006.** NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **103**: 12481-12486.
94. **Tam W, Dahlberg JE. 2006.** miR-155/BIC as an oncogenic microRNA. *Genes Chromosomes. Cancer* **45**: 211-212.
95. **Tang G, Reinhart BJ, Bartel DP, Zamore PD. 2003.** A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes Dev.* **17**: 49-63.
96. **van der Krol AR, Mur LA, Beld M, Mol JN, Stuitje AR. 1990.** Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell* **2**: 291-299.

97. **Vogelstein B, Gillespie D. 1979.** Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **76**: 615-619.
98. **Wiemer EA. 2007.** The role of microRNAs in cancer: no small matter. *Eur.J.Cancer* **43**: 1529-1544.
99. **Yates J, Warren N, Reisman D, Sugden B. 1984.** A cis-acting element from the Epstein-Barr viral genome that permits stable replication of recombinant plasmids in latently infected cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **81**: 3806-3810.
100. **Yekta S, Shih IH, Bartel DP. 2004.** MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science* **304**: 594-596.
101. **Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. 2003.** Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* **17**: 3011-3016.
102. **Yoshimori R, Roulland-Dussoix D, Boyer HW. 1972.** R factor-controlled restriction and modification of deoxyribonucleic acid: restriction mutants. *J.Bacteriol.* **112**: 1275-1279.
103. **Young LS, Rickinson AB. 2004.** Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat.Rev.Cancer* **4**: 757-768.
104. **Zeng Y, Cullen BR. 2003.** Sequence requirements for micro RNA processing and function in human cells. *RNA* **9**: 112-123.
105. **Zeng Y, Wagner EJ, Cullen BR. 2002.** Both natural and designed micro RNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells. *Mol.Cell* **9**: 1327-1333.
106. **Zhu JY, Pfuhl T, Motsch N, Barth S, Nicholls J, Grasser F, Meister G. 2009.** Identification of novel Epstein-Barr virus microRNA genes from nasopharyngeal carcinomas. *J.Virol.* **83**: 3333-3341.
107. **Zimber U, Adldinger HK, Lenoir GM, Vuillaume M, Knebel-Doeberitz MV, Laux G, Desgranges C, Wittmann P, Freese UK, Schneider U, . 1986.** Geographical prevalence of two types of Epstein-Barr virus. *Virology* **154**: 56-66.
108. **Zitzler J. 2004.** *Oxidativer Stress - assoziierter neuronaler Zelltod und die Identifikation neuroprotektiver Gene durch ein neuartiges*

Screening-System. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.

9. Danksagung

Herrn Prof. Dr. N. Müller-Lantzsch und seiner Nachfolgerin Frau Prof. Dr. S. Smola danke ich für die freundliche Aufnahme in das Institut und die Unterstützung während meiner Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. F. A. Grässer für die Überlassung des Themas, sein Vertrauen und die stete Diskussionsbereitschaft.

Ein herzlicher Dank geht an Frau Dr. Stephanie Barth für die gute Betreuung, ihre Geduld und die Vermittlung vieler Arbeitsmethoden und Sichtweisen.

Bedanken möchte ich mich bei Frau Ruth Nord und ganz besonders bei Herrn Dr. Thorsten Pfuhl für die gewissenhafte Einarbeitung und die bereitwillige Hilfe bei Problemen mit verschiedenen Arbeitsmethoden.

Bei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Grässer Frau Dipl. Biologin Natalie Motsch und Herrn Dipl. Biologe Alfredo Mamiani bedanke ich mich für die Zusammenarbeit und das gute Arbeitsklima.

Frau Barbara Best und den übrigen Mitarbeitern der Virologie danke ich für die freundliche Arbeitsatmosphäre.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir mein Studium ermöglicht und mich jederzeit bestens unterstützt haben.

10. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Lothar Leißner
Anschrift:	Kirrberger Str. 11 B 66424 Homburg (Saar) Telefon: 06841-924697 E-Mail: lotharleissner@gmx.de
Geboren:	11.01.1980, Mülheim a. d. Ruhr
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Schul Ausbildung:

1986-1990	Städt. Gemeinschaftsgrundschule am Krähenbüschken
1990-1999	Städt. Gymnasium Broich
Juni 1999	Abitur

Zivildienst:

1999-2000	Krankenpflege Evangelisches Krankenhaus Mülheim/Ruhr
-----------	--

Studium:

WS 2000/01	Beginn in Homburg
SS 2002	Physikum
SS 2005	1. Staatsexamen (alt)
Oktober 2006	Beginn der Promotionsarbeit
Mai 2009	2. Staatsexamen (neu)